

Análisis Multi-Locus de Secuencias Repetitivas en Tándem de Número Variable y Perfil de Virulencia de *Staphylococcus aureus* aislados de niños que concurren a hospitales de referencia de Gran Asunción

Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis and Virulence Profile of *Staphylococcus aureus* isolates from children that attended to reference hospitals from Gran Asunción

RESUMEN

Staphylococcus aureus constituye una amenaza para la salud humana debido a su capacidad de causar una variedad de infecciones con amplio rango de severidad, como resultado de la producción de diversos factores de virulencia. La comprensión de su epidemiología es compleja debido a la alta variabilidad genética del patógeno. Este trabajo observacional descriptivo de corte transversal se realizó con el objetivo de caracterizar el perfil de virulencia y la variabilidad genética de 113 aislados de *Staphylococcus aureus* obtenidos de niños que concurren a 4 hospitales de referencia de Gran Asunción en el año 2010. Los análisis moleculares incluyeron la detección genes codificantes de la leucocidina de Pantón Valentine (PVL), enterotoxinas A, B, C, D y H, hemolisinas alfa y beta y toxinas exfoliativas A y B; además de la tipificación de secuencias multi-locus de número variable de repeticiones en tándem (MLVA). El factor de virulencia más frecuente fue la leucocidina de PVL, seguido de las hemolisinas alfa y beta. El análisis MLVA dio resultados congruentes con otras técnicas moleculares mundialmente aceptadas como la MLST, *Spa typing* y PFGE. Se distinguieron 105 perfiles diferentes dentro de los cuáles, resaltan 5 agrupaciones que contienen de 2 a 4 aislados, con un mismo perfil. Este trabajo además de generar los primeros datos de virulencia y variabilidad de *S. aureus* provenientes de niños de Paraguay, ha permitido la implementación a nivel nacional de técnicas con fundamento molecular que pueden ser aplicadas para resolver diversos problemas relevantes en salud pública asociados a infecciones o brotes originados por este microorganismo.

Palabras Claves: *Staphylococcus aureus*, MLVA, factores de virulencia, niños

SUMMARY

Staphylococcus aureus is considered a threat for human health because it is capable of produce great number of infections with a wide range of severity, mainly as a result of the production of several virulence factors. It is complex to fully understand the epidemiology of this pathogen because of its high genetic variability. This descriptive and transversal study was aimed to characterize the virulence profile and the genetic variability of 113 *S. aureus* isolates obtained from children that attended to four reference hospitals from Gran Asunción in 2010. Molecular analysis included the detection of: Panton Valentine leukocidin (PVL), enterotoxins A, B, C, D and H, alpha and beta hemolysins, A and B exfoliative toxins; furthermore multiple-locus variable number tandem of repeat analysis (MLVA). PVL was the most frequent virulence factor followed by alpha and beta hemolysins. MLVA analysis showed congruent results compared with international validated molecular techniques such as MLST, Spa typing and PFGE. 105 different MLVA profiles were distinguished, including 5 clusters that contained from 2 to 4 isolates with the same profile. This study has showed the first results concerning virulence profiles and variability data from *S. aureus* isolated from children in Paraguay, besides it has allowed the implementation of molecular techniques at the national level that could be applied in the future to solve relevant problems in public health linked to infections or outbreaks caused by this microorganism.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, MLVA, virulence factors, children

1.Introducción

1.1. Generalidades

Las enfermedades infecciosas han sido la causa predominante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial a lo largo de la historia de la humanidad, lo que no sólo ha restringido el bienestar de las personas sino que, además, ha cercenado la prosperidad social de las primeras civilizaciones. Recién en el siglo XX, con el descubrimiento de la penicilina, las mejoras en las condiciones de vida y la optimización de las intervenciones médicas, las sociedades actualmente desarrolladas, emergieron de esta situación. Aún así, actualmente un tercio de las muertes que ocurren en el mundo se deben a las infecciones microbianas (1,2).

Las bacterias gram-positivas, especialmente los cocos, con excepción de los bacilos gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, son los microorganismos aislados con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas humanas en el laboratorio de microbiología. Históricamente el *Staphylococcus aureus* es sin duda el patógeno más importante entre los estafilococos, y continúa siendo una de las bacterias más comúnmente implicadas en infecciones humanas a nivel mundial. Está ampliamente distribuido en la naturaleza y puede ser recuperado del ambiente o como habitante comensal de la piel, las mucosas y otros sitios del cuerpo de los seres humanos y los animales. El mismo es miembro ubicuo de la flora microbiana humana, con hasta 20-30% de colonización asintomática persistente en humanos y 50-60% de colonización intermitente. Aproximadamente un tercio de la población general a nivel mundial es portadora de *S. aureus* en fosas nasales, esta colonización asintomática es conocida como factor de riesgo para posteriores infecciones (3-5).

1.2. *Staphylococcus aureus*. Características generales.

En 1880, Pasteur describió y cultivó al *S. aureus*. Hacia 1881, Sir Alexander Ogston fue quien lo denominó con los siguientes términos derivados del griego *staphyle* = racimos y *kokkos* = granos. Este microorganismo forma parte de la familia *Micrococcaceae*, género *Staphylococcus*,

el cual contiene más de 30 especies diferentes; es un coco gram-positivo, no móvil, no formador de esporas, puede encontrarse solo, en pares o en racimos. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. Resiste al calor y a la desecación y puede crecer en condiciones de salinidad (7,5% NaCl). Crece rápidamente en agar sangre, y produce dos enzimas: la catalasa y coagulasa, entre otras, siendo ésta última responsable de la actividad de coagulación del plasma citratado, principal característica que lo diferencia de los demás estafilococos. Sus colonias miden de 1 a 3 mm y producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides, por lo que reciben la denominación *aureus* = dorado, muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas. Su característica bioquímica más importante es la fermentación de varios azúcares, entre ellos, el manitol para producir ácido láctico (6,7).

En el 2013, el CDC (Center for Disease Control and Prevention) de Estados Unidos incluyó a *S. aureus* en la categoría de "**microorganismo de amenaza seria**" para la salud humana a nivel mundial, debido a que es capaz de causar una multitud de infecciones con un amplio rango de severidad, desde infecciones cutáneas leves e intoxicaciones alimentarias hasta enfermedades invasivas y potencialmente mortales como el síndrome del shock tóxico, meningitis, endocarditis, osteomielitis, neumonía necrotizante y septicemia. En ambientes hospitalarios es la principal causa de infecciones nosocomiales, y actualmente también se la considera como la bacteria más comúnmente responsable de infecciones graves en la comunidad. La diversidad patogénica de esta bacteria refleja su habilidad para colonizar exitosamente, adaptarse y sobrevivir en diferentes tejidos celulares durante la infección. La portación de genes que codifican factores de virulencia y otros que confieren resistencia a los antibióticos, podría contribuir a una progresión más rápida y complicada de la enfermedad bajo determinados factores ambientales (8-14).

1.3. Factores de Virulencia

El *S. aureus* tiene la capacidad de producir un amplio espectro de factores de virulencia (**Tabla 1**), en su mayoría proteínas que le confieren la habilidad de adaptarse y crecer en distintas condiciones ambientales, por lo que contribuyen en muchos casos, a su capacidad de producir enfermedades. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y toxinas como hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La función principal de estas proteínas es la de ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas, las toxinas exfoliativas y la leucocidina de Pantón Valentine(7).

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *S. aureus*^a.

Estructurales	Enzimas	Toxinas
Peptidoglucano	Catalasa	Hemolisina alfa
Proteína A	Hialuronidasa	Hemolisina beta
Factores de Adhesión	Lipasas	Hemolisina gamma
Ácidos teicoicos	Coagulasa	Hemolisina delta
Polisacáridos capsulares	Nucleasas	Leucocidina de Pantón Valentine (PVL) ^{*b}
	Proteasas	Enterotoxinas estafilocócicas (SE) ^{*c}
	Estafilocinasa	Toxina-1 síndrome del shock tóxico (TSST-1) ^{*d}
	Colagenasa	Toxinas exfoliativas (ETA y ETB) ^{*e}

^a Extraído de Bustos-Martínez, JA; Gutiérrez-Cárdenas, M et al 2006 (7)

*Siglas en inglés

^b PVL: Pantón-Valentine leukocidin

^c SE: Staphylococcal enterotoxin

^d TSST-1: Toxic Shock Syndrome Toxin-1

^e ETA: Exfoliative Toxin A; ETB: Exfoliative Toxin B

Estos factores de virulencia se clasifican teniendo en cuenta si forman parte estructural de la bacteria (asociados a la pared celular) o si son liberados al medio extracelular como enzimas o toxinas. Las más comunes proteínas estafilocócicas ancladas en la pared celular son aquellas con afinidad a fibrinógeno, fibronectina, colágeno, sialoproteína, elastina y adhesinas con función desconocida. Entre ellas podemos mencionar, una gran variedad de adhesinas de superficie, que han sido usadas como marcadores de moléculas adhesivas a la matriz: la cápsula de polisacárido externa que sirve para evitar la fagocitosis del microorganismo, la presencia de la proteína A que estimula reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato y retardado, los constituyentes de la pared celular como peptidoglicano y ácidos teicoicos que, aparte de conferir rigidez y elasticidad a la estructura del microorganismo, también contribuyen a la virulencia. El segundo grupo de factores de virulencia está representado por enzimas como la catalasa, hialuronidasa, lipasas, coagulasa, nucleasas, proteasas, estafilococinasa, colagenasa, una familia de proteínas bacterianas con actividad superantigénica (activa de manera exacerbada el sistema inmunológico): enterotoxinas, toxina del síndrome del shock tóxico-1, toxinas exfoliativas A y B y otras toxinas como hemolisinas (alfa, beta, gama, delta) y la leucocidina de Panton Valentine, las cuáles son proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano (1,7,9).

1.3.1. Leucocidina de Panton Valentine (PVL)

La PVL es una citotoxina, que ejerce su efecto tóxico directo sobre la membrana de los leucocitos polimorfonucleares humanos, desencadenando una respuesta inflamatoria que incluye la desgranulación del citoplasma, la liberación de mediadores inflamatorios, el edema celular y la lisis. Esta proteína produce lisis leucocitaria pero no exhibe actividad hemolítica. Es una toxina compuesta por dos proteínas S y F (LukS-PV y LukF-PV, respectivamente), que actúan de manera sinérgica para producir granulocitopenia profunda pero reversible. Su forma de acción

involucra la formación de poros que alteran la permeabilidad celular al potasio y otros cationes, y como consecuencia se produce la destrucción leucocitaria y necrosis tisular (**Figura 1**). Los genes que codifican las sub-unidades de la leucocidina de Pantón Valentine son *lukS-PV* y *lukF-PV*, separados por una timina, que se cotranscriben, y están ubicados en un bacteriófago, los mismos fueron clonados y secuenciados por Prevost y colaboradores en 1995 (15–20).

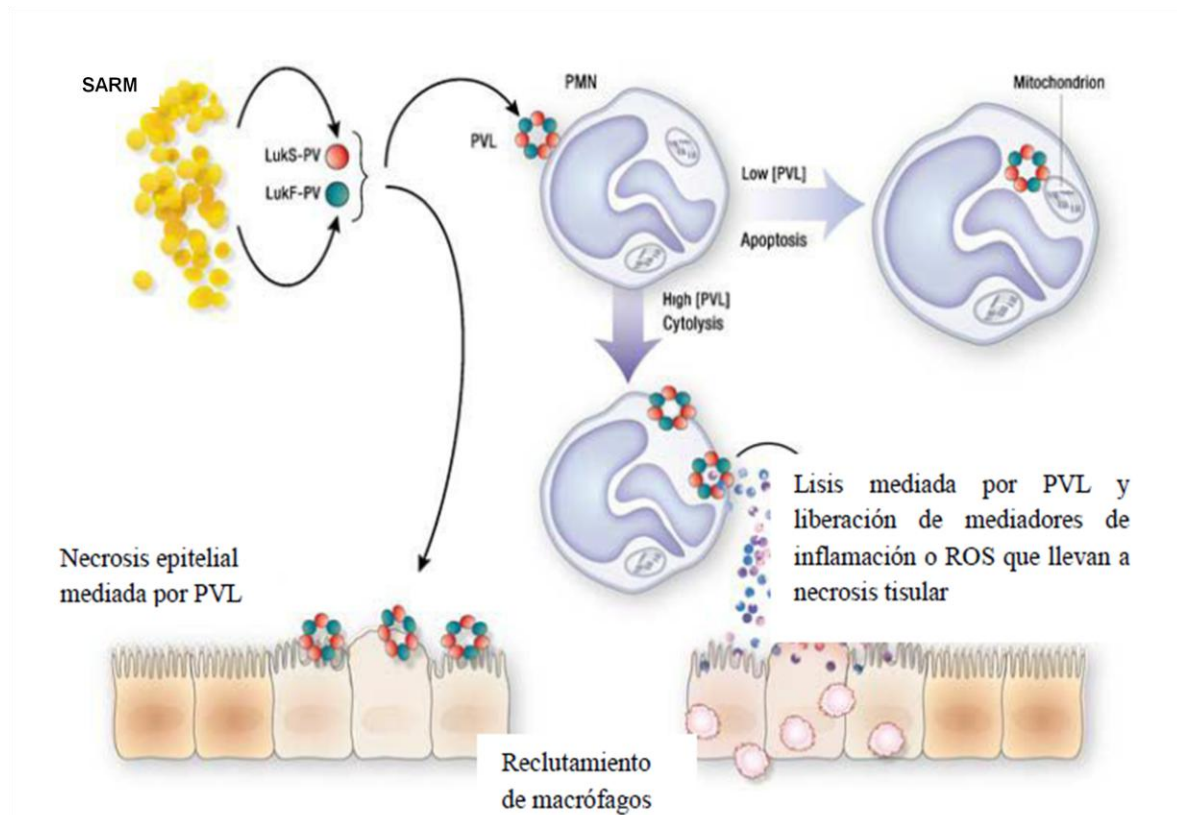


Figura 1. Mecanismo de acción propuesto para necrosis tisular inducida por PVL. Los dos péptidos de PVL son secretados por *S. aureus*, luego son ensamblados en la membrana de los PMN. Concentraciones elevadas de PVL causa la lisis de los PMN mientras que concentraciones bajas median la vía de apoptosis por la unión directa a la membrana mitocondrial. La necrosis tisular podría resultar de la liberación de ROS o como resultado de la respuesta inflamatoria causada por la liberación de las granulaciones de los PMN. **SARM:** *S. aureus* resistente a metilicina; **PMN:** polimorfonucleares; **Low [PVL]:** baja concentración de PVL; **High [PVL]:** alta concentración de PVL; **Cytolysis:** citólisis; **Mitochondrion:** mitocondrias. **ROS:** especies reactivas de oxígeno. Extraído de Boyle 2007 (21).

Inicialmente se relacionó a las cepas de *S. aureus* portadoras de la leucocidina de Pantone Valentine como principales causantes de infecciones invasivas y asociadas a la comunidad. Sin embargo, en los últimos años, se identificó como un factor importante responsable de infecciones de piel y partes blandas, en cepas caracterizadas por infectar principalmente a individuos jóvenes y sanos, que no han tenido contacto previo con trabajadores de la salud o no han estado en un ambiente hospitalario, lo que sugiere que la infección es adquirida en la comunidad principalmente. Actualmente, aunque existe un consenso de que las cepas de *S. aureus* portadoras de PVL están epidemiológicamente ligadas a infecciones severas de piel y neumonía necrotizante, se mantiene la controversia sobre si la PVL es en sí patogénica por sí sola (16,17,21).

1.3.2. Hemolisinas alfa y beta

Las hemolisinas de *S. aureus* son proteínas que poseen varias funciones biológicas y están codificadas por genes cromosómicos. La hemolisina alfa es con mucho, una de las citotoxinas más estudiadas de éste microorganismo. Es producida por un alto porcentaje de cepas y es tóxica para un gran número de células mamíferas. Es una citotoxina formadora de poros que tiene efectos letales para una amplia variedad de tipos celulares, entre ellos los monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas, y células endoteliales. La hemolisina alfa, secretada por *S. aureus*, se integra a la membrana de las células blanco, formando heptámeros cilíndricos que son capaces de lisar las células eucariotas. Los poros que producen permiten la entrada y salida de iones y moléculas pequeñas que eventualmente producen la muerte de las células nucleadas y la lisis osmótica de los eritrocitos, por lo que es responsable del halo de eritrocitos hemolizados que se observa alrededor de las colonias de algunas cepas de *S. aureus* que se desarrollan en agar sangre de carnero. La formación de poros también produce eventos secundarios que promueven el desarrollo de secuelas patológicas. Estos eventos incluyen la activación de endonucleasas,

exocitosis del contenido plaquetario y liberación de citocinas y mediadores inflamatorios. La producción de tromboxanos y prostaciclina activa los mecanismos de vasoconstricción, además, al romperse la integridad celular aumenta la permeabilidad vascular. El efecto final en el huésped es el edema pulmonar o síndrome de dificultad respiratoria. La alfa hemolisina es además dermonecrótica (por inoculación subcutánea), neurotóxica y puede ser letal para ciertos animales (1,7).

La hemolisina beta es una esfingomielinasa, tiene actividad de fosfolipasa C, actuando sobre una gran variedad de células. La diferencia en la susceptibilidad de los eritrocitos a la hemolisina beta se debe al diferente contenido de esfingomielina, mayor en los eritrocitos. Su función durante la enfermedad no está determinada claramente. Sin embargo se ha visto que le produce una ventaja selectiva a la bacteria (15).

1.3.3. Toxinas exfoliativas A y B

Las toxinas exfoliativas (ET) de *S. aureus* son proteínas extracelulares responsables de las manifestaciones cutáneas de la enfermedad denominada impétigo bulloso, y en su forma diseminada del síndrome estafilocócico de la piel escaldada (SSSS, por sus siglas en inglés). Este síndrome consiste en una dermatitis exfoliativa, que afecta principalmente a neonatos y niños pequeños, que resulta de la infección por *S. aureus* productor de toxinas exfoliativas A y B; se caracteriza por la formación de grandes ampollas sin infiltrado de células inflamatorias y separación de extendidos de la epidermis del estrato granuloso, dejando la queratina intacta. Las toxinas exfoliativas A (ETA) y B (ETB) son las principales responsables y poseen variabilidad biológica y serológica. La ETA, proteína de 26.9 kDa, es codificada por el gen *eta*, ubicado en el cromosoma bacteriano y comparte 40% de la identidad aminoacídica con ETB, cuyo gen codificante, el *etb*, está presente en un plásmido de 27.3 kDa. A pesar de los numerosos estudios

realizados, todavía no se conoce el mecanismo exacto por el cual estas toxinas ocasionan las alteraciones de la piel características del SSSS (22,23).

1.3.4. Enterotoxinas estafilocóccicas A, B, C, D y H

Las enfermedades de transmisión alimentaria abarcan un amplio espectro de dolencias y constituyen un problema de salud pública creciente en todo el mundo. Se deben a la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas. Actualmente, existen aproximadamente 250 ETAs descritas, siendo las bacterias responsables de dos tercios de éstas. El *S. aureus* es el agente etiológico más frecuente entre las intoxicaciones de origen alimentario, especialmente graves en las causadas por cepas productoras de enterotoxinas. La presencia de *S. aureus* portador de enterotoxinas en alimentos manufacturados se debe a la contaminación introducida por los manipuladores, por inadecuadas prácticas de manufactura o por la utilización de materia prima contaminada. La presencia de enterotoxinas en un aislado de *S. aureus* aumenta el riesgo de infección gastrointestinal. Las enterotoxinas estafilocóccicas (SE), son un grupo de proteínas de cadena simple y de bajo peso molecular (26 a 34 kDa), que son producidas durante todas las fases del crecimiento bacteriano. Son altamente termoestables y resistentes a la mayoría de las enzimas proteolíticas y a diferentes condiciones ambientales. Los principales tipos de enterotoxinas detectados en intoxicaciones alimentarias son SEA, SEB, SEC, SED y SEE. Sin embargo, en la actualidad se reconocen 13 nuevos tipos de enterotoxinas cuya implicancia en la salud pública todavía no está totalmente dilucidada, estas son las enterotoxinas SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER y SEU. Cada una de ellas está codificada por un gen que se suele denominar con el prefijo “se” o “ent” seguido de la letra a la que corresponda la enterotoxina que codifica. La mayoría de estos genes se encuentran localizados en elementos móviles, de este modo, los genes que codifican las enterotoxinas SEA y SEE se encuentran en un fago, los que codifican las enterotoxinas SED y SEJ se encuentran en

plásmidos y los que codifican las enterotoxinas SEB, SEC, SEK, SEL Y SEP se localizan en islas de patogenicidad (SaPI3, SaPI4, SaPIbov). Los genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* y a veces *seu*, pertenecen a un operón denominado *egc* (24–27).

1.4. Epidemiología del *Staphylococcus aureus*

Con el fin de comprender la epidemiología del *S. aureus* y estudiar el impacto de las medidas de control adoptadas para evitar la propagación de la infección, es necesaria la caracterización inequívoca de los aislados, a nivel de clon. En este contexto, se entiende por clon a las cepas descendientes de un ancestro común. La epidemiología de este microorganismo es compleja debido a la circulación de cientos de clones a nivel mundial, por ello, para la definición de clones es necesario conocer: secuenciotipo (ST), el complejo clonal (CC), el tipo de *cassette SCCmec*, la tipificación del locus *spa*, así como la portación de factores de virulencia (28,29).

Los clones de *S. aureus* asociados a infecciones comunitarias más comúnmente conocidos a nivel mundial son el USA300 (ST8-SARM-IV-PVL, *arc-A*) y USA400 (ST1-SARM-IV), que ocasionaron grandes epidemias en Estados Unidos en la última década. El clon USA300 es una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina que ha emergido como agente causal de infecciones de piel y partes blandas, de prótesis articulares y neumonía necrotizante. Las razones de su emergencia siguen sin estar claras, pero probablemente se relacione con los factores de virulencia únicos en su biología que le permiten propagarse de persona a persona en la comunidad y causar enfermedades invasivas severas en huéspedes susceptibles (28,29).

Entre las cepas más importantes causantes de brotes nosocomiales se encuentran las EMRSA-15 (ST22-SARM-II) y EMRSA-16 (ST36-SARM-II), ambas resistentes a meticilina. Estos son los clones epidémicos más frecuentes en el Reino Unido. La mayoría de los clones SARM circulantes en América Latina están relacionados a los 5 principales clones internacionales: NYJ, Pediátrico, Brasileño, Ibérico y Húngaro (29,30).

En Paraguay, Mayor y colaboradores en el 2007 reportaron los clones Cordobés/chileno (CC5-ST5-MRSA-I) y Brasileiro (CC8-ST239-MRSA-IIIA), como los circulantes en Paraguay a nivel hospitalario (31).

Los métodos de tipificación molecular se han constituido en una herramienta que complementa a los procedimientos fenotípicos, extendiendo los alcances de la epidemiología y permitiendo un mayor entendimiento de los problemas asociados al proceso salud-enfermedad, incrementando la posibilidad de implementar medidas efectivas de control epidemiológico. En este contexto, muchos métodos han sido empleados para tipificar, diferenciar y agrupar los aislados de *S. aureus*, los cuáles aportan información adicional y complementaria a las técnicas de laboratorio convencional. La decisión de emplear un método molecular radica en las ventajas que presenta el mismo frente a los convencionales: simplicidad, alto rendimiento, mayor poder discriminatorio y fácil ejecución (28,32–34).

Por muchos años, los métodos de tipificación de fagos han sido empleados para el estudio de *S. aureus*, pero éstos han sido reemplazados por otros más actuales. Los usados más frecuentemente incluyen ribotipificación, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), y métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dirigidos a la amplificación de elementos repetitivos. Uno de los inconvenientes de la PFGE y los métodos basados en PCR es que pueden producirse diferencias de resultados interlaboratoriales, debido a la alta variabilidad y a la rápida evolución de las regiones del genoma bacteriano a las cuáles se dirigen. Por tanto, el desarrollo de adecuados y precisos métodos de tipificación de aislados de *S. aureus*, que permitan el monitoreo de brotes locales y la diseminación a gran escala de clones peligrosos es un motivo de preocupación a nivel mundial (11,29,35,36).

1.4.1. Métodos moleculares para tipificar *S. aureus*

En este contexto se han desarrollado diferentes métodos moleculares que estudian diferentes características del genoma (**Tabla 2**). Estas características pueden cambiar independientemente unas de otras afectando parámetros esenciales de los métodos de tipificación, principalmente el poder discriminatorio, por esta razón algunas relaciones establecidas entre aislados inferidas por un método de tipificación pueden no coincidir de forma exacta con las obtenidas por otros métodos, sin embargo pueden ser complementarias entre sí cuando se utilizan conjuntamente (28,36).

La PFGE es un método de alto poder discriminatorio por basarse en el análisis de polimorfismo del genoma completo generado por la utilización de la enzima *SmaI*. Actualmente el PFGE es considerado el “*gold standard*” en la tipificación de una variedad de bacterias, incluyendo al *S. aureus*, a pesar de sus limitaciones: ser laborioso, requerir mucho tiempo para su realización, equipamientos específicos y costosos. Éste método es considerado una excelente herramienta para analizar brotes y eventos de transmisión de aislados entre diferentes centros, también ha sido utilizado con éxito en investigaciones epidemiológicas a gran escala. Sin embargo, no se encuentra bien establecido para análisis epidemiológicos globales, en los que se requieren procedimientos que detecten la variación genética acumulada a lo largo del tiempo. En Paraguay un solo laboratorio tiene acceso a esta técnica y el mismo siendo un laboratorio de referencia debe aplicarlo a varias especies bacterianas (11,35–37).

Tabla 2. Características de los métodos moleculares empleados para el estudio de variabilidad genética de *S. aureus*.

MÉTODOS MOLECULARES DE TIPIFICACIÓN				
Características	PFGE^a	MLVA^b	MLST^c	<i>Spa Typing</i>^d
Región estudiada	Genoma completo	7 genes constitutivos	7 genes constitutivos	1 sólo gen
Método molecular empleado	Restricción enzimática	Amplificación por PCR	Secuenciación	Secuenciación
Usos	Estudios epidemiológicos a corto plazo.	Epidemiología largo y corto plazo	Estudios epidemiológicos a largo plazo	Estudios de macro y micro evolución
Ventajas	<i>Gold standard</i>	Específico, rápido, fácil ejecución y bajo costo.	Resultados no ambiguos, buena comparación interlaboratorial	Fácil de desarrollar
Desventajas	Difícil comparación interlaboratorial, laborioso y costoso	Necesita confirmación posterior con otros métodos de tipificación como PFGE	Aplicación de rutina inviable	Agrupación de aislados compleja

^a *Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de campo pulsado)*. Extraído de Rivero-Pérez 2010 (38).

^b *Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (Análisis polimórfico de locus múltiples con número variable de repeticiones en tándem)*. Extraído de Bustamante 2009 (37).

^c *Multilocus sequence typing (Tipificación de secuencias multilocus)*. Extraído de Rivero-Pérez 2010 y Schouls 2009 (35,38).

^d *Spa-sequence Typing (Tipificación de secuencias de la Proteína A)*. Extraído de Schouls 2009 (35).

Entre los métodos de tipificación de *S. aureus* basados en el análisis de la variación de la secuencia en ciertas regiones del genoma se destacan MLST (*Multilocus sequence typing*) y *spa typing*. El MLST es un método ideal para estudios epidemiológicos a largo plazo, está basado en el análisis de las secuencias de siete genes constitutivos, por lo que tiene poder discriminatorio

menor a la PFGE. Tiene la ventaja de arrojar resultados no ambiguos apropiados para comparación interlaboratorial, pero su aplicación en laboratorios de rutina es inviable por su elevado costo. Otro método de tipificación de *S. aureus* es la secuenciación del gen codificante de la proteína A (*Spa-sequence typing*, *Spa typing*), en el que se analiza la variación de una región del genoma colindante con el gen de la proteína A que presenta repeticiones en tándem. El *spa typing* es fácil de desarrollar, tiene un poder discriminatorio intermedio entre PFGE y MLST, sin embargo, está basado en el análisis de un sólo locus del genoma, por lo que su poder discriminatorio es menor que la PFGE y MLST, y la agrupación de los aislados en base a los datos obtenidos es compleja (35,38).

La elección del método de tipificación adecuado es crucial en varios tipos de análisis epidemiológicos: por ejemplo los análisis de brotes requieren métodos con alto poder discriminatorio, mientras que los de menor potencial de resolución son adecuados para estudios de evolución a largo plazo (36).

1.4.2. Análisis de Polimorfismo de Locus Múltiples con Número Variable de Repeticiones en Tándem (*MLVA, Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism*)

Durante los últimos años, la secuenciación del genoma completo de algunas bacterias, permitió el descubrimiento de nuevos marcadores moleculares caracterizados por ser altamente polimórficos y presentar un número variable de secuencias repetitivas asociadas en tándem, denominados VNTRs (*Variable-Number Tandem Repeat*). Las regiones VNTR se caracterizan por presentar un número variable de unidades repetitivas en el mismo locus. Este número de repeticiones varía frecuentemente de un aislado a otro y puede ser detectado por PCR utilizando oligonucleótidos que flanquean la región. Esta metodología ha sido ampliamente utilizada para análisis de identidad biológica de especies eucariotas y procariotas, siendo el fundamento de los

ensayos de paternidad en humanos. En el caso específico de *S. aureus* se han desarrollado diferentes sistemas VNTR útiles para estudios de tipificación molecular (37,39).

La secuenciación de *S. aureus* permitió observar la presencia de numerosos loci VNTR, que incluían *sdr*, *clfA*, *clfB*, *ssp*, *coa* y *spa*. El locus *sdr* comprende dos o tres marcos de lectura abierta estrechamente vinculados y dispuestos en tándem, que son *sdrC*, *sdrD* y *sdrE*, los cuales codifican las proteínas SDR. Las proteínas SDR, junto con los factores de aglutinación A (ClfA, Clumping factor A) y B (ClfB, Clumping factor B), son miembros de una familia de proteínas de superficie, caracterizadas por la presencia de una región “R” que contiene varias unidades de repetición ricas en Ser-Asp, codificadas por repeticiones de 18 nucleótidos de ADN en la región 3’ de los genes *sdr*. El locus *ssp* contiene un gen (*sspA*) codifica una serina proteasa (proteasa V8), cuyo fragmento C-terminal, está construido de múltiples y variados tripéptidos repetidos codificados por nueve unidades de repetición nucleotídicas. Finalmente, los genes *coa* y *spa* codifican para la proteína de unión a colágeno y la proteína A, respectivamente, que presentan un variado número de repeticiones degeneradas de 81 y 24 pares de bases. Este polimorfismo ha sido comúnmente utilizado para distinguir aislados de *S. aureus* entre sí. Sabat y colaboradores en el 2003 describieron el MLVA para discriminar entre diferentes aislados clínicos de *S. aureus* basados en el análisis de siete loci individuales (*ClfA*, *ClfB*, *SdrC*, *SdrD*, *SdrE*, *SspA* y *spA*), que son amplificados de manera simultánea mediante una PCR múltiple. La variabilidad en el número de repeticiones en tándem de las secuencias cortas es utilizada para crear perfiles de ADN para estudios epidemiológicos mediante el empleo de dendogramas (**Figura 2**). Este método de exploración de polimorfismos de VNTRs, permite la tipificación de un gran número aislados de *S. aureus*, la determinación de su diversidad y el relacionamiento evolutivo con alto poder discriminatorio y niveles de reproducibilidad interlaboratorial comparable a la PFGE (11,35,38–40).

La técnica MLVA ha sido empleada para el análisis de otras especies bacterianas médicamente relevantes como *Escherichia coli* (Bustamante, 2009), *Clostridium difficile* (Killgore, 2008), *Haemophilus influenzae* (Van Belkum, 2007), y su uso está bien establecido en ellas, debido a que se puede utilizar con eficacia para localizar focos u otras formas de diseminación bacteriana. Esta es considerada una técnica molecular de tipificación bacteriana moderna, oportuna y versátil (37,41,42).

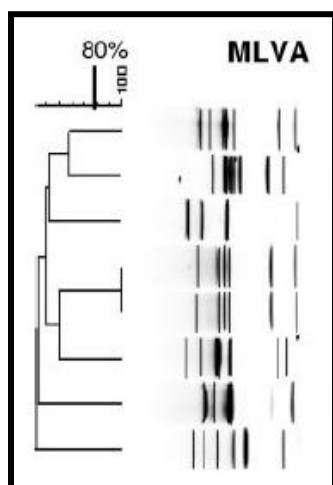


Figura 2. Dendograma y perfil de productos amplificados por MLVA. Se genera un perfil de bandas correspondiente a productos de diferente tamaño para cada aislado (sección derecha), a partir del cual se obtiene el dendograma (sección izquierda). En este ejemplo se emplea como criterio de agrupación en un *cluster* a aquellos aislados que presentan el 75% de bandas idénticas. Extraído de Tenover y colaboradores, 2007(43).

Lo relevante de la puesta a punto de la técnica radica, en las ventajas de ser rápida y económica, por lo que puede ser empleada para realizar un screening de gran cantidad de aislados en caso de brotes, permitiendo identificar aquellos diferentes y agrupar los similares.

1.4.3. Análisis de Agrupamientos

Una de las aplicaciones de la epidemiología molecular es el análisis de la relación genética existente entre cepas. Cientos de diferentes patrones de bandas electroforéticas pueden ser generados y las relaciones existentes entre éstos son estudiadas por métodos de agrupación basándose en la similitud entre aislados, como los denominados **análisis de agrupamientos** (*cluster analysis*) (28).

El análisis de agrupamientos consiste en una serie de técnicas analíticas utilizadas para organizar los datos en grupos según índices de similitud o diferencia. Es utilizado para búsqueda de patrones en una colección de datos, el cual puede incluir patrones de bandas electroforéticas, como los generados por los productos de PCR obtenidos por cada aislado utilizando la técnica MLVA. Éstos varían en tamaño y la combinación de los mismos genera un patrón de bandas característico del aislado en estudio, el cual permite la comparación con otros aislados mediante el uso de softwares informáticos que generan dendogramas. Un dendograma es una representación gráfica del proceso de agrupamiento en forma de árbol que resulta de la disposición en estructura jerárquica de los patrones de bandas obtenidos (**Figura 3**). En estos gráficos, el eje de ordenadas adquiere verdadero protagonismo pues representa los distintos niveles de similitud en torno al cual han sido agrupadas las unidades de análisis en función de la medida elegida. Por su parte, en el eje de abscisas únicamente se identifican los casos u observaciones. La limitación que posee esta representación gráfica, es que sólo se puede emplear cuando el número de casos es reducido ($n < 200$), pero constituye un resumen de la información original presente en la matriz de distancias o similitudes y la información que presenta será útil cuanto más similares sean (en cuanto a características clínicas y demográficas de las muestras) los datos que represente (28,44,45).

1.5. Antecedentes en Paraguay

Los pocos trabajos publicados que muestran datos de caracterización molecular y variabilidad genética de *S. aureus* en Paraguay han sido realizados en el extranjero y hacen referencia a aislados nosocomiales. En el trabajo publicado por Mayor y colaboradores en el 2007 se analizaron 34 muestras de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) nosocomiales, en las cuales por medio de PFGE y detección del cassette *SCCmec* se identificaron dos clones diferentes: el mayoritario fue el ST5/ST221, *spa type* t1 49, *SCCmec* I, similar al clon Córdoba/chileno que se

expandió a través de Sudamérica, y el minoritario ST239/ST889, *spa type t037*, *SCCmec IIIA* (relacionado al clon brasilero). En este caso los aislados paraguayos fueron analizados molecularmente en Francia (31).

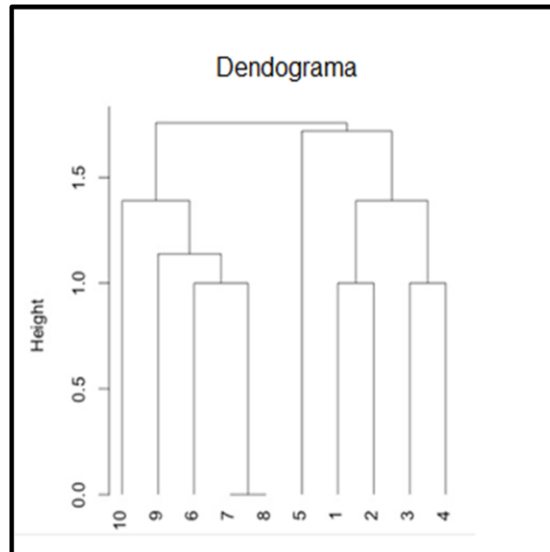


Figura 3. Ejemplo de dendrograma. En el eje de ordenadas se representan los distintos niveles de similitud en torno al cual se han ido agrupando las unidades de análisis en función de la medida elegida y en el eje de abscisas se identifican los casos u observaciones. Se analizan 10 aislados diferentes, de los cuales, son idénticos entre sí, los aislados 1 y 2, por otro lado el 3 y 4 y también los aislados 7 y 8 entre sí. Los aislados 1, 2, 3 y 4 aparentemente presentan un ancestro común, así como los aislados 6, 7, 8, 9 y 10 (46).

Por otra parte el artículo publicado por Weiler y colaboradores en el 2011 estudió un brote epidémico asociado al consumo de leche ultrapasteurizada que afectó a varias ciudades del Dpto. Central, en el cual se aisló *S. aureus* subespecie *aureus* de 5 pacientes, 3 operarios y 3 muestras de leche. Todas las cepas fueron productoras de enterotoxinas C y D. Las aislamientos de 3 pacientes, de un operario y de las muestras de leche fueron analizados por PFGE en el Instituto Malbrán de Buenos Aires Argentina y se observó un patrón único de macrorrestricción, identificando por tanto a la leche como fuente de intoxicación y a un operario de la línea de producción como origen de la contaminación. Este es el primer brote de ETA denunciado en

Paraguay en el cual se pudo aislar, caracterizar y subtipificar molecularmente el agente etiológico en la planta de elaboración, en el alimento y en las personas afectadas (47).

Recientemente un grupo de investigación multidisciplinario de distintos hospitales de referencia de Asunción y Dpto. Central ha realizado trabajos enfocados a la caracterización molecular de *S. aureus* aislados tanto de portadores sanos que se desempeñaban como trabajadores de la salud de un hospital pediátrico de referencia del país, como de niños con infecciones adquiridas en la comunidad (48,49). Los resultados obtenidos en trabajadores de la salud mostraron una frecuencia de 32,5% (41/126) de portación nasal de *S. aureus*, de los cuales 31,7% (13/41) fueron resistentes a meticilina y presentaron el gen *mecA*. El gen que codifica para la Leucocidina de Pantón Valentine, se detectó en el 4,9% (2/41) de los aislados, ambos meticilino sensibles. Mientras que un estudio multicéntrico realizado en el año 2010, en el cual participaron cuatro hospitales de referencia del departamento central de nuestro país incluyó el análisis de un total de 123 aislados de *S. aureus* provenientes de niños con infecciones adquiridas en la comunidad, causantes de infecciones graves en un 20% de los casos y 3 (tres) óbitos. Este trabajo permitió observar un 18,7% (23/123) de resistencia global a meticilina, con cifras de resistencia antibiótica diferentes entre los distintos hospitales; el 39% (48/123) de los aislados eran portadores del gen de la PVL (*lukS/F-PV*), siendo mayor la frecuencia de portación en *S. aureus* sensibles a meticilina (*SASM*) 31% (38/123). Estos datos coinciden con los reportados por la Red de Vigilancia de Resistencia a antimicrobianos del Laboratorio Central de Salud Pública del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (LCSP-MSP y BS), que en su apartado de noticias e informaciones del 5 de julio del 2013, indican que los niveles de portación de *S. aureus* resistentes a meticilina son de: 32% en cepas comunitarias y 46% en cepas hospitalarias. (49–51).

La gravedad de las infecciones ocasionadas por *S. aureus* se ha puesto de manifiesto en casos puntuales que alcanzaron nivel público como el caso de una niña, que a través de una simple lesión de codo causada por un accidente hogareño, fue afectada por el *S. aureus*, que le causó septicemia, falla multiorgánica, lo que condujo al deceso de la misma, a pesar de los cuidados intensivos que recibió (52).

En este contexto, surgió la idea de ampliar la gama de factores de virulencia que puedan ser detectados por métodos moleculares en el estudio de muestras paraguayas y establecer un método sencillo que permitiese tipificar los distintos aislados de *S. aureus*. La importancia de esta innovación trasciende el beneficio directo de los pacientes incluidos en el proyecto base, ya que su potencial sería el empleo de estos métodos moleculares para la caracterización de *S. aureus* en futuras situaciones de brotes, intoxicaciones alimentarias, el control de portadores tanto en ámbitos hospitalarios como en manipuladores de alimentos y estudios epidemiológicos varios, pudiendo de esta forma identificar la relación existente entre aislados.

2.Objetivos

2.1.Objetivo General

Analizar perfiles MLVA y detectar genes que codifican factores de virulencia en aislados de *Staphylococcus aureus* comunitarios de muestras de niños colectados en hospitales de referencia de Asunción y el departamento Central, durante el año 2010.

2.2.Objetivos Específicos

- Estandarizar técnicas moleculares para detección de factores de virulencia y el análisis de variabilidad genética por la metodología MLVA.
- Detectar portación de genes que codifican factores de virulencia: enterotoxinas A, B, C, D y H, hemolisinas alfa y beta, toxinas exfoliativas A y B, empleando la técnica de PCR.
- Identificar la variabilidad genética de los aislados de *S. aureus* estudiados empleando la técnica MLVA.
- Describir la frecuencia de portación de genes que codifican factores de virulencia y la variabilidad genética de los aislados de *S. aureus* estudiados y agruparlos por perfiles de MLVA obtenidos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Diseño del Estudio y Población

En este trabajo observacional, descriptivo, con muestreo no probabilístico de conveniencia se estudiaron 113 aislados de *S. aureus* obtenidos de niños menores de 15 años que acudieron a 4 hospitales de referencia de Asunción y el Dpto. Central, que habían sido colectados en el marco del proyecto titulado “***Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad: Caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños que concurren a hospitales de referencia de Asunción y Dpto. Central**” realizado durante el año 2010 y que se encontraban criopreservados en el Dpto. de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (**Figura 4**). El citado proyecto de investigación estaba orientado a determinar características clínicas, microbiológicas, así como la presencia de los genes *mecA* y *lukS/F-PV* en aislados de *S. aureus* adquiridos de la comunidad que causaron infecciones en niños. Los hospitales participantes fueron: Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñú (HGP), Hospital de Clínicas (HCL), Instituto de Previsión Social (IPS) y Hospital Nacional de Itauguá (HNI), siendo todos estos de alta complejidad, así como responsables de cobertura sanitaria a un alto porcentaje de la población de Asunción y del Dpto. Central.

Los 113 aislados de *S. aureus* analizados en este trabajo provenían de muestras clínicas como secreciones de piel, partes blandas o líquidos corporales (líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, sangre) de niños menores a 16 años de edad que concurren a los 4 hospitales de referencia ya mencionados y se encontraban criopreservados en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IICS, con identificación y ficha epidemiológica completa del paciente a quien pertenecían. Se buscó excluir fenómenos de portación en individuos sanos y posibles infecciones intrahospitalarias: por tanto no se colectaron aislados de *S. aureus* provenientes de puntas de catéter, secreción traqueal; así como

también fueron excluidos aquellos que no presentaban datos clínicos completos o con falta de identificación y conservación apropiadas. Se consideró como infección adquirida en la comunidad, aquella que fue diagnosticada antes de las primeras 48 horas de la internación, con documentación microbiológica.

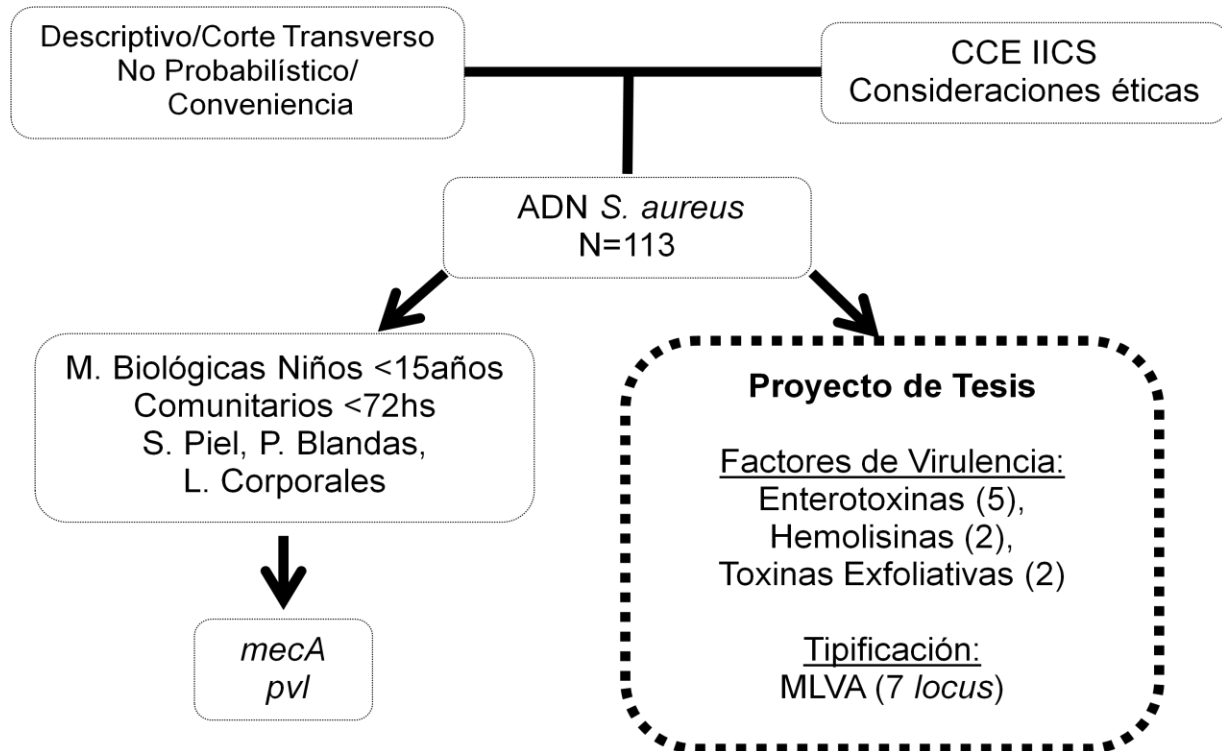


Figura 4. Esquema del protocolo empleado.

Los datos microbiológicos de los aislados empleados en este protocolo provinieron de fichas epidemiológicas diseñadas específicamente para el proyecto de investigación anterior (**ANEXO B**). El aislamiento, la identificación y antibiograma de los aislados de *S. aureus* se realizó en cada uno de los laboratorios de microbiología participantes del proyecto marco de los cuáles provenían los mismos, para lo cual se siguieron los procedimientos estandarizados que constan en los manuales de procedimientos de cada laboratorio. Las pruebas de susceptibilidad in vitro a los antimicrobianos se realizó por dos métodos: difusión de Kirby-Bauer, empleando discos de la marca Oxoid/BBi siguiendo los criterios del NCCLS/CLSI y mediante sistemas automatizados

empleando equipos Vitek®2 de la compañía BioMérieux, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el acceso a estos datos se contó con la aprobación de los investigadores del citado protocolo y se han mantenido las autorías (ANEXO C).

3.2. Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

3.2.1. Cepas de Referencia utilizadas

Se utilizó como cepa control el *S. aureus* ATCC ® 29213 (*mecA* negativo y productor de una β -lactamasa débil) y *S. aureus* ATCC ® BAA-1708 (resistente a meticilina y mupirocina) cedidas gentilmente por la Dra. Juana Ortellado del laboratorio de Microbiología del Hospital de Clínicas de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. La detección del gen *luk-PV* codificante para el factor de virulencia leucocidina de Panton Valentine, fue realizada en un proyecto anterior en el 2010 (P20), dentro de la línea de investigación del Dpto. de Biología Molecular y Biotecnología, empleando los mismos aislados de este estudio, y utilizó como control positivo de los genes *mecA* y *luk-PV* la cepa *S. aureus* ATCC ® 43300 portadora de los genes *mecA* y *pvl*; gentilmente proporcionada por el Dr. Gabriel Gutkind de la cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. También se utilizaron como cepas control, para la estandarización de la técnica MLVA, 11 aislados caracterizados fenotípicamente en el marco de una tesis de maestría llevada a cabo previamente en el Dpto. de Biología Molecular y Biotecnología y genotípicamente caracterizadas mediante la colaboración de la Dra. Claudia Sola de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (49,50).

3.2.2. Medios de cultivo

Para el crecimiento del *S. aureus* se utilizó medio de cultivo agar sangre de carnero al 5%. Para la preparación del medio de cultivo se siguieron las instrucciones del fabricante: se suspendió 42,5 g de Agar Base Columbia (BBL TM Columbia Agar Base - Becton, Dickinson and

Company – BD, USA-France) por cada litro de agua destilada, se mezcló bien y se dejó hervir por un minuto, con agitación constante. Se autoclavó a 121°C por 15 minutos. Se dejó enfriar a 45°C – 50°C y se agregó 50 mL de sangre de carnero desfibrinada. Se plaqueó en placas de petri estériles descartables de 90 mm de diámetro.

3.2.3. Condiciones de crecimiento y conservación

Las cepas, que se encontraban criopreservadas en BHI-Glicerol 15% a -80°C, fueron cultivadas en agar sangre de carnero al 5% e incubadas a 35°C por 24-48 horas en atmósfera de 5% de CO₂, para la posterior extracción del ADN (**Figura 5**).

3.3. Caracterización genotípica

3.3.1. Extracción del ADN

La extracción de ADN para la detección de los genes que codifican factores de virulencia, se realizó por el método de ebullición, siguiendo el protocolo descrito previamente por Zhang y colaboradores en el 2004 con algunas modificaciones. Un par de colonias frescas fueron suspendidas en 300 µL de agua destilada estéril, luego sometidas a dos ciclos seguidos de 10 minutos de ebullición y 10 minutos en hielo a 4°C y posterior centrifugación por 10 min a 13000 rpm. El sobrenadante conteniendo el ADN fue conservado a -20°C (53).

La extracción del ADN para el análisis de MLVA fue realizada empleando un kit comercial para extracción de ADN genómico (Wizard Genomic, Promega, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído posteriormente fue conservado a -20°C.

3.3.2. Cuantificación del ADN

Para estimar la cantidad de ADN obtenido tras la extracción de ADN con el método comercial, se realizó la lectura de la absorbancia a 260 nm y 280 nm utilizando un cuantificador de ADN (Biowave DNA, WPA, UK) y se tuvo en cuenta la relación de que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 50 ng/µL de ADN.

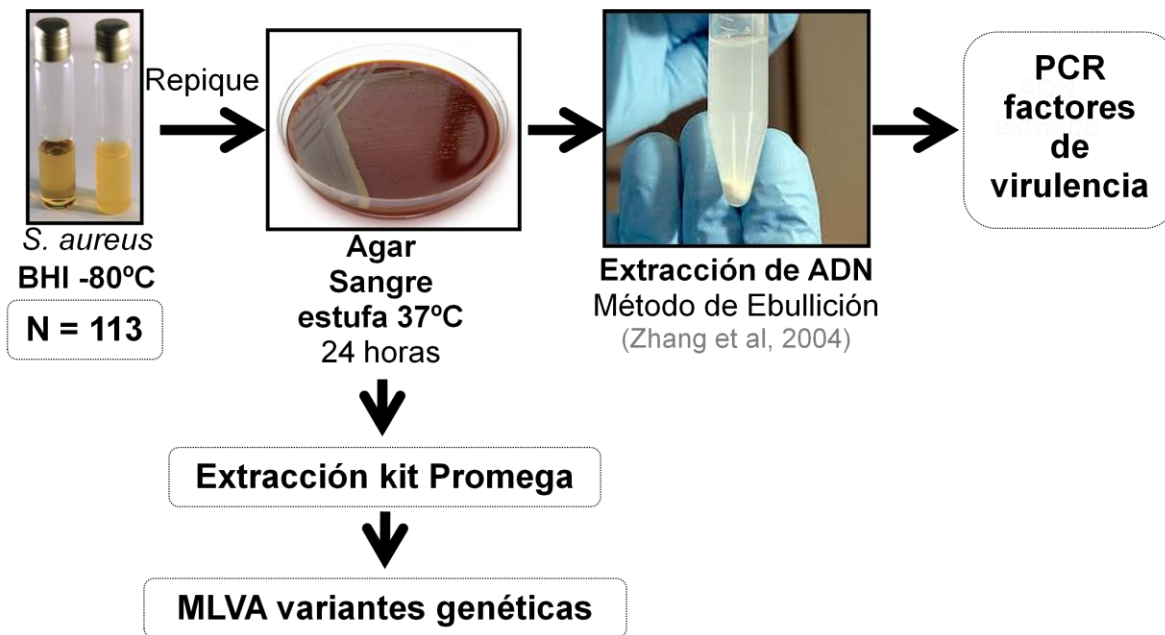


Figura 5. Esquema utilizado para el repique y extracción de los aislados de *S. aureus*

3.3.3. FACTORES DE VIRULENCIA

3.3.3.1. Amplificación de ADN por PCR para detección de factores de virulencia

El método de extracción simplificado y rápido de ADN, descrito por Zhang y colaboradores 2004 fue efectivo para la detección de los genes codificantes de los distintos factores de virulencia *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seh*, *hla*, *hly*, *eta* y *etb* de *S. aureus*. Los aislados fueron molecularmente identificados como *S. aureus* por medio de la amplificación del gen codificante del *ARNr 16S* específico para *S. aureus*. En los pocos casos que la identificación del gen codificante del *ARNr 16S* dio resultado negativo, la presencia del ADN bacteriano de *S. aureus* fue confirmada por PCR utilizando los oligonucleótidos *femB* descrito por Pérez-Roth 2001, así como la confirmación mediante la repetición de las pruebas bioquímicas de identificación. Todas las reacciones de PCR dieron como resultado productos de amplificación de tamaño esperado (Tabla 3) (40,54).

Tabla 3. Locus detectados en las reacciones de PCR*.

Locus marcador	Producto obtenido	Diseño de oligonucleótidos
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 4em; margin-right: 10px;">{</div> <div> <p><i>sea</i></p> <p><i>seb</i></p> <p><i>sec</i></p> <p><i>ARNr 16S</i></p> <p><i>sed</i></p> <p><i>seh</i></p> </div> </div>	521 pb	Manfredi y col. 2010
	667 pb	
	284 pb	
	228 pb	
	385 pb	
	358 pb	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 4em; margin-right: 10px;">{</div> <div> <p><i>hla</i></p> <p><i>hlb</i></p> </div> </div>	704 pb	Wang y col. 2010
	496 pb	
<i>Clfa, Clfb, SdrCDE, SpA, SspA (MLVA)</i>	Diversos tamaños	Sabat y col. 2003
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 4em; margin-right: 10px;">{</div> <div> <p><i>eta</i></p> <p><i>etb</i></p> </div> </div>	119 pb	Johnson, WM y col. 1990
	200 pb	

*Se muestran los genes buscados, los tamaños de productos esperados y el autor del diseño de los oligonucleótidos empleados. Los genes incluidos en las distintas reacciones de PCR múltiples llevadas a cabo se indican con corchetes.

3.3.3.2. Amplificación de genes *hla* y *hlb*

Con el objetivo de poder amplificar los genes codificantes de las hemolisinas alfa y beta, se estandarizaron las condiciones de reacción para una PCR múltiple, empleando los oligonucleótidos descritos por Wang y colaboradores en el año 2011 (55). Los reactivos utilizados y sus concentraciones óptimas para la reacción de PCR se detallan en la **Tabla 4**. Para la reacción de PCR se utilizó 2,5 µL de ADN molde obtenido por el método de ebullición en un volumen total de reacción de 25 µL. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 1

minuto), anillamiento (60°C por 45 segundos) y extensión (72°C por 1 minuto), y extensión final a 72°C por 1 minuto. Se utilizó el termociclador Esco Healthcare (Swift, Max Pro, Singapur).

3.3.3.3. Amplificación de genes *eta* y *etb*

La amplificación de los genes codificantes de las toxinas exfoliativas A y B en simultáneo, se realizó por PCR múltiple empleando los oligonucleótidos descritos por Johnson y colaboradores en el año 1990 (56); utilizando las siguientes condiciones de reacción descritas en la **Tabla 4**. Para la reacción de PCR se utilizó 2,5 µL ADN molde obtenido por el método de ebullición en un volumen total de reacción de 25 µL. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 2 minutos), anillamiento (55°C por 2 minutos) y extensión (72°C por 1 minuto), y extensión final a 72°C por 5 minutos. Se utilizó el termociclador Esco Healthcare (Swift, Max Pro, Singapur).

Tabla 4. Mezcla de reacción de PCR para la detección de genes *hla*, *hla*, *hla* y *hla*.

Reactivos	Concentración final en la Reacción	
	<i>hla/hla</i> ^a	<i>hla/hla</i> ^b
<i>Buffer</i> (Bioron, Alemania)	1X	1X
dNTPs (Takara, Japón)	0,4mM	0,4mM
Oligonucleótidos <i>Forward</i> (Macrogen, Corea)	1 µM	1 µM
Oligonucleótidos <i>Reverse</i> (Macrogen, Corea)	1 µM	1 µM
MgCl ₂ (Bioron, Alemania)	1,5 mM	3 mM
Taq polimerasa (Bioron, Alemania)	1 U	1U

^a PCR múltiple de amplificación de los genes *hla* y *hla*

^b PCR múltiple de amplificación de los genes *hla* y *hla*

3.3.3.4. Amplificación de genes *sea*, *seb*, *sec* y gen codificante del *ARNr 16S*

Para amplificar los genes codificantes de enterotoxinas A, B y C, así como el control interno de amplificación *ARNr 16S* en simultáneo, se estandarizaron las condiciones de reacción para una PCR múltiple, empleando oligonucleótidos descritos por Manfredi y colaboradores en el año 2010 (25). Los reactivos utilizados y sus concentraciones óptimas para la reacción de PCR se describen en la **Tabla 5**. Para la reacción de PCR se utilizó 2,5 µL de ADN molde obtenido por el método de ebullición en un volumen total de reacción de 25 µL. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 15 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 segundos), anillamiento (68°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 30 segundos), seguidos de 20 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 segundos), anillamiento (60°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 30 segundos) y extensión final a 72°C por 2 minutos. Se utilizó el termociclador Applied Biosystems-2720 Thermal Cycler (Singapur).

3.3.3.5. Amplificación del gen *sed*

Para amplificar el gen codificante de enterotoxina D, se estandarizaron las condiciones de reacción para una PCR simple, empleando oligonucleótidos descritos por Manfredi y colaboradores en el año 2010 (25). Los reactivos utilizados y sus concentraciones óptimas se describen en la **Tabla 5**. Para la reacción de PCR se utilizó 2,5 µL de ADN molde obtenido por el método de ebullición en un volumen total de reacción de 25 µL. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 15 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 segundos), anillamiento (68°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 30 segundos), seguidos de 20 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 segundos), anillamiento (60°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 30 segundos) y extensión final a

72°C por 2 minutos. Se utilizó el termociclador Applied Biosystems-2720 Thermal Cycler (Singapur).

3.3.3.6. Amplificación del gen *seh*

La amplificación del gen codificante de la enterotoxina H, se realizó por PCR simple, empleando oligonucleótidos descritos por Manfredi y colaboradores en el año 2010 (25) bajo las condiciones descritas en la **Tabla 5**. Para la reacción de PCR se utilizó 2,5 µL de ADN molde obtenido por el método de ebullición en un volumen total de reacción de 25 µL. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 15 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 segundos), anillamiento (68°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 30 segundos), seguidos de 20 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 segundos), anillamiento (60°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 30 segundos) y extensión final a 72°C por 2 minutos. Se utilizó el termociclador Applied Biosystems-2720 Thermal Cycler (Singapur).

3.3.3.7. Amplificación del gen *femb*

La amplificación del gen codificante del gen *femb*, empleado como control interno de amplificación para *S. aureus*, se realizó por PCR simple, empleando oligonucleótidos descritos por Pérez-Roth y colaboradores en el año 2001 (40) bajo las condiciones descritas en la **Tabla 5**. Para la reacción de PCR se utilizó 2,5 µL de ADN molde obtenido por el método de ebullición en un volumen total de reacción de 25 µL. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 10 ciclos de amplificación: desnaturalización (94°C por 30 segundos), anillamiento (64°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 45 segundos), seguidos de 25 ciclos de desnaturalización (94°C por 45 segundos), anillamiento (50°C por 45 segundos) y extensión (72°C por 1 minuto) y extensión final a 72°C

por 10 minutos. Se utilizó el termociclador Applied Biosystems-2720 Thermal Cycler (Singapur).

Tabla 5. Mezcla de reacción de PCR para detección de genes de enterotoxinas y *ARNr 16S*.

Reactivos	Concentración final en la Reacción			
	<i>sea/seb/sec/ARNr 16S^a</i>	<i>sed^b</i>	<i>seh^c</i>	<i>femb^d</i>
<i>Buffer</i> -KCl (Fermentas, EU)	1X	1X	1X	1X
dNTPs (Fermentas, EU)	0,4mM	0,4mM	0,4mM	0,4mM
Oligonucleótidos <i>Forward</i> (Macrogen,Corea)	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
Oligonucleótidos <i>Reverse</i> (Macrogen,Corea)	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
MgCl ₂ (Fermentas, EU)	3 mM	3 mM	3 mM	3mM
Taq polimerasa (Fermentas, EU)	1 U	1U	1U	1U

^a PCR múltiple de amplificación de los genes *sea*, *seb*, *sec* y control interno *ARNr 16S*

^b PCR de amplificación del gen *sed*

^c PCR de amplificación del gen *seh*

^d PCR de amplificación del gen *femb*

3.3.3.8. Obtención de muestras control para factores de virulencia

Como no se contaba con controles positivos para la detección de genes codificantes de los factores de virulencia incluidos en este trabajo, se realizó como estrategia de búsqueda un screening de 259 aislados de *S. aureus*, con el objeto de identificar muestras a ser utilizadas como control positivo en las determinaciones de factores de virulencia por PCR. Estos 259 aislados, provenientes del Biobanco de ADN del laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del IICS, provenían de la ejecución de varios proyectos de investigación. Los productos amplificados de tamaño esperado para cada gen fueron secuenciados (Macrogen, Corea), para comprobar la identidad se compararon las secuencias obtenidas con aquellas de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, EEUU) y

posteriormente fueron alineadas mediante el uso del software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Las muestras cuyos productos arrojaron un porcentaje de identidad de mayor o igual al 90% fueron utilizadas como control positivo. La estrategia utilizada se muestra en la

Figura 6.

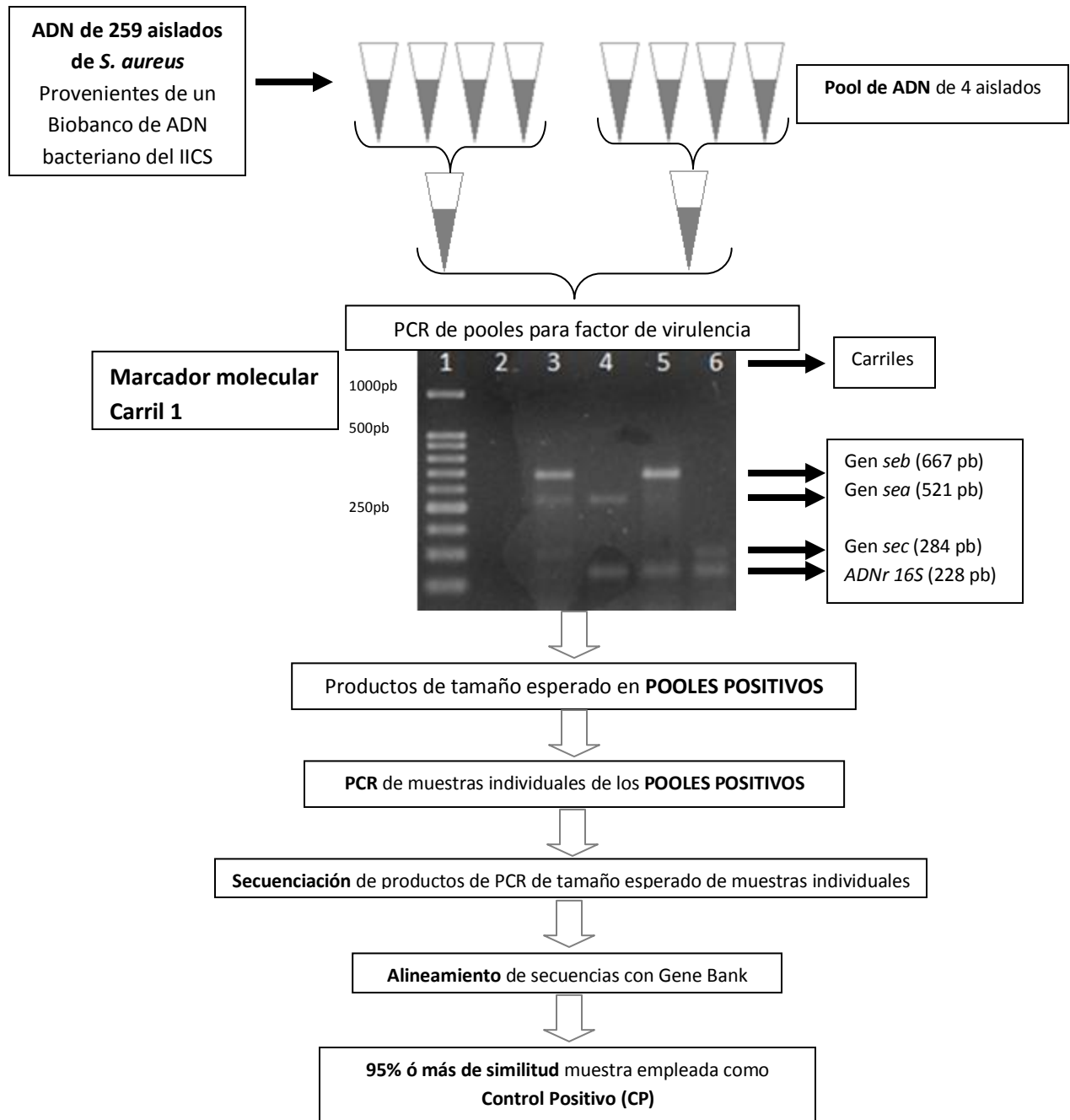


Figura 6. Esquema del procedimiento seguido para la obtención de controles positivos para la detección de factores de virulencia por PCR.

3.3.3.9. Separación de fragmentos de ADN. Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los genes que codifican factores de virulencia se procedió a realizar electroforesis en geles de agarosa al 2%, sembrando 5 µL de producto de PCR mezclado con 2µL de loading buffer 6X y corrida en cubas electroforéticas con buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) al 1X a 110V por 40 minutos aproximadamente y posterior tinción con bromuro de etidio al 0,5µg/mL. Para la comparación de tamaño de los productos obtenidos se utilizó marcador de peso molecular de 100 pb Fermentas (ThermoScientific, Estados Unidos). Los resultados fueron registrados en formato de fotos digitales y analizados con el software de KODAK Digital Science DC 120 (USA).

3.3.4. ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA

3.3.4.1. Análisis de Polimorfismo de Locus Múltiples con Número Variable de Repeticiones en Tándem (*MLVA, Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism*)

La técnica MLVA se basa en una PCR múltiple en la que se amplifican 7 locus: *ClfA*, *ClfB*, *SrdC*, *SrdD*, *SrdE*, *SpA*, *SspA* utilizando 5 oligonucleótidos descritos por Sabat y colaboradores en el 2003 y el posterior análisis de la variabilidad genética se hace por comparación del patrón de bandas generado por diversos amplicones.

3.3.4.2. Estandarización de la técnica MLVA

Para la estandarización y validación de las condiciones de amplificación tanto de cada locus individualmente, como en forma simultánea, se decidió emplear 11 aislados SARM, provenientes de un proyecto anterior (P24/09, aprobado en fecha 01/09/2009) caracterizados previamente fenotípica como genotípicamente. El genotipado incluía datos de portación de genes *mecA* y *luk-PV* realizados en Paraguay y tipificación por PFGE, MLST, locus *spa* y cassette *SCCmec* realizada por la Dra. Claudia Sola del Dpto. de Bioquímica Clínica de la Facultad de

Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba en carácter de gentil colaboración (Figura 7).

Se procedió a la estandarización de la reacción de PCR múltiple, separación de fragmentos de ADN y obtención e interpretación del dendograma, empleando siempre los mismos 11 aislados seleccionados con el fin de analizar reproducibilidad de la MLVA y validarla al compararla con la PFGE, que es el método *gold standart* para tipificación de *S. aureus*.

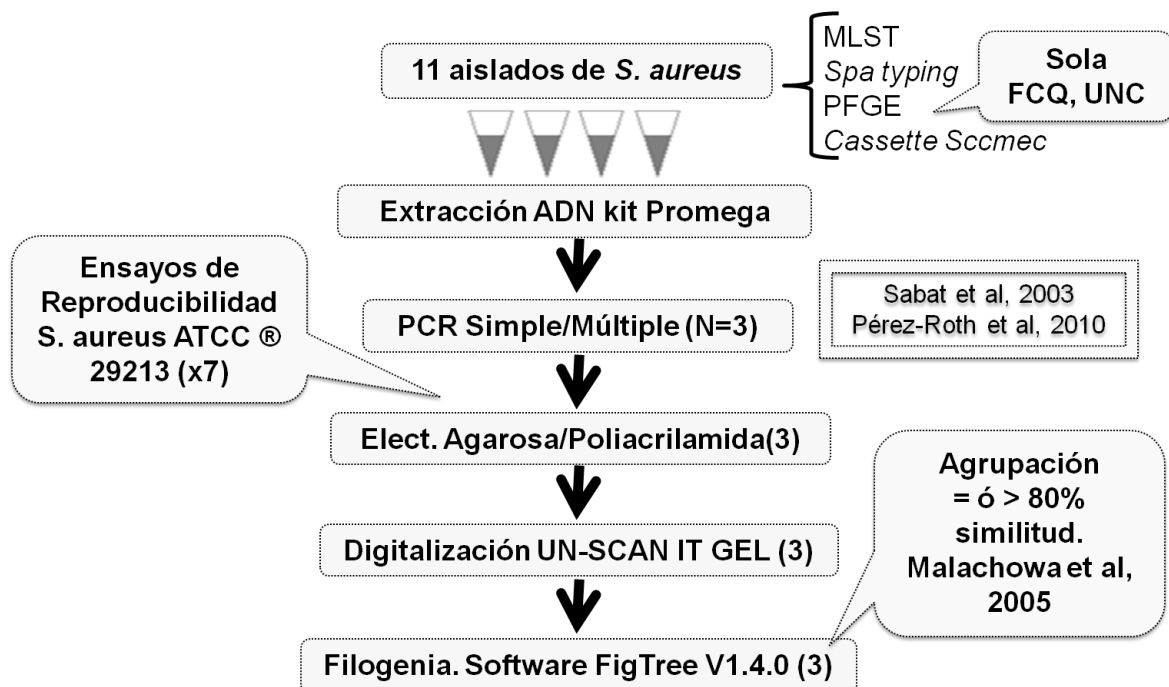


Figura 7. Esquema de trabajo empleado para la estandarización de la MLVA. Todas las reacciones durante el proceso de estandarización y validación de la metodología MLVA fueron realizadas por triplicado. Los ensayos de reproducibilidad del tamaño de los amplicones empleando la cepa *S. aureus* ATCC 29213 fueron realizados en siete ocasiones.

3.3.4.3. Condiciones de reacción MLVA

La PCR múltiple para amplificación de los 7 locus, utilizando los 5 oligonucleótidos se realizó con algunas modificaciones (38,39). Los reactivos utilizados y sus concentraciones óptimas para la reacción de PCR fueron las descritas en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Mezcla de reacción de PCR para la MLVA.

Reactivos	[Final] Rx <i>hla/hlb</i> ^a
<i>Buffer</i> (Bioron, Alemania)	0,8 X
dNTPs (Takara, Japón)	0,2 mM
<i>ClfA</i> -F/R (Macrogen, Corea)	2 μ M
<i>ClfB</i> -F/R (Macrogen, Corea)	1,2 μ M
<i>SdrCDE</i> -F/R (Macrogen, Corea)	1,2 μ M
<i>SspA</i> -F/R (Macrogen, Corea)	1 μ M
<i>SpA</i> -F/R (Macrogen, Corea)	0,5 μ M
MgCl ₂ (Bioron, Alemania)	1,5 mM
Taq polimerasa (Bioron, Alemania)	1 U
DMSO	5%

Además se buscó determinar la concentración óptima de ADN como molde de amplificación para la reacción, por lo que se procedió a realizar reacciones de amplificación con concentraciones de ADN que variaban desde: 20 a 80 ng. Para la reacción de PCR se utilizó 40ng de ADN molde obtenido por el método de extracción con kit comercial (Promega) en un volumen total de reacción de 20 μ L. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 20 ciclos de desnaturalización (94°C por 30 segundos), anillamiento (58,2°C por 45 segundos) y extensión (72°C por 1,5 minuto), extensión final a 72°C por 5 minutos. Se utilizó el termociclador Esco Healthcare (Swift, Max Pro, Singapur).

3.3.4.4. Separación de fragmentos de ADN. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para el análisis de los productos de PCR obtenidos en el MLVA se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida (gel separador 7,5%, gel concentrador 5%). 7 μ L de producto de PCR mezclado con 2 μ L de loading buffer 6X y corrida en buffer TBE (Tris- Borato-EDTA) al 0,5X durante 55 minutos a 800V, 200mA, 30W y potencia constante igual a 10W. Tinción con Nitrato

de Plata siguiendo el protocolo descrito por Sambrook en 1987 (57). Los geles de poliacrilamida una vez teñidos fueron secados entre acetato y papel para ser archivados.

3.3.4.5. Obtención e Interpretación del Dendograma

Los productos de PCR obtenidos por cada aislado utilizando la técnica MLVA varían en tamaño y la combinación de los mismos genera un patrón de bandas característico del aislado en estudio, el cual permite la comparación con otros aislados mediante el uso de un software informático que genera un dendograma.

Estos productos de PCR obtenidos con la técnica MLVA, así como el marcador de peso molecular de 100pb Fermentas (Thermo Scientific, Estados Unidos) incluido en cada gel, fueron visualizados en geles de poliacrilamida, digitalizados y analizados con el software UN SCAN IT GEL 6.1. Este software emplea los datos de pesos moleculares conocidos del marcador y la movilidad electroforética del mismo para determinar el peso molecular de cada producto de PCR obtenido, a partir de cada aislado analizado, por comparación con el marcador. Estos datos se emplearon para realizar un dendograma que agrupe los perfiles de MLVA en base a su similitud mediante el uso de los softwares Treeview versión X 0.5.1 y R i386 3.0.1. El criterio para la agrupación fue que todas las cepas con bandas de igual tamaño ó de hasta 1 bandas de diferencia (> ó = a 85% similitud) pertenezcan a la misma agrupación, mismo criterio utilizado por Malachowa y col. en el 2005. Las agrupaciones fueron numeradas para su identificación, como lo recomendaron Sabat y colaboradores en su publicación de la metodología en el 2003. Posterior a eso se realizó la comparación de patrones MLVA obtenidos entre los aislados para establecer existencia de proximidad evolutiva(36,39).

3.3.4.6. Análisis de reproducibilidad del dendograma

Para testar la reproducibilidad de los patrones obtenidos se repitió tres veces la PCR MLVA, la corrida electroforética y el dendograma de las 11 cepas de referencia mencionadas

anteriormente, caracterizadas fenotípica y genotípicamente, empleadas en la etapa de estandarización de la técnica. Se incluyó como control de amplificación y de corrida electroforética la cepa *S. aureus* ATCC ® 29213 en cada uno de los experimentos, para verificar de esta manera la reproducibilidad del patrón de bandas.

3.4. Consideraciones Éticas

Este proyecto empleó como muestras de estudio aquellas colectadas en el marco de un protocolo anterior (P20) realizado en el año 2010 que contaba con la aprobación del comité científico y ético del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, en el cual se estudió ADN bacteriano de aislados de *S. aureus* obtenidos a partir de muestras biológicas procesadas en los laboratorios de microbiología de los hospitales participantes del estudio, en respuesta a un pedido médico, por lo tanto el protocolo original no conllevó a la extracción de muestras adicionales al paciente, ni riesgo alguno para su salud. El resultado de antibiograma proporcionado por los laboratorios de microbiología a cada paciente fue suficiente para orientar el tratamiento de la infección. Los resultados del estudio original y del presente trabajo no influyen en el tipo de tratamiento que recibió el paciente en su momento, ya que los mismos fueron determinados empleando el criterio médico basado en el antibiograma.

Se mantuvo la confidencialidad en el manejo de los datos de los aislados, dado que los mismos fueron manejados de manera estricta con códigos para su identificación. La información obtenida se manejó exclusivamente con fines científicos de carácter epidemiológico.

El protocolo del estudio actual cuenta con la aprobación de todos los investigadores del protocolo anterior, se han mantenido las autorías, así como también se ha sometido a consideración de los comités científico y de ética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, obteniendo su aprobación (P44/2012) previamente a la realización del mismo.

3.5. Estadística y Gestión de Datos

Los datos de los aislados obtenidos de las fichas epidemiológica, microbiológica y molecular fueron introducidos y almacenados en una planilla electrónica y los cálculos estadísticos fueron realizados empleando los softwares Microsoft Excel versión 2003 y Epiinfo Versión 3.2. Se empleó estadística descriptiva para referir las características de la población, frecuencia de los genes detectados y los perfiles de MLVA analizados. Las variables dicotómicas fueron expresadas como porcentajes. Los resultados se presentaron en tablas y gráficos.

4.Resultados

4.1. Características clínicas y demográficas de niños con infecciones por *S. aureus*

Las muestras estudiadas, correspondientes a 113 aislados de *S. aureus*, provenían de 59 niños (52,2%) con una media de edad de 72 ± 59 meses, y 54 niñas (47,8%) con una media de edad de 54 ± 62 meses. El rango de edades para ambos sexos fue de 1 día a 15 años. El análisis por franja etaria mostró que la franja de 0 a 60 meses de edad presentó el mayor número de casos de infección por *S. aureus* correspondiente al 62,8% (n=71) del total de aislados, seguido por las franjas etarias de 121 a 180 meses 23,9% (n=27) y 61 a 120 meses 13,3% (n=15). Esta tendencia de distribución por franja etaria se mantuvo en los cuatro hospitales participantes (**Figura 8**).

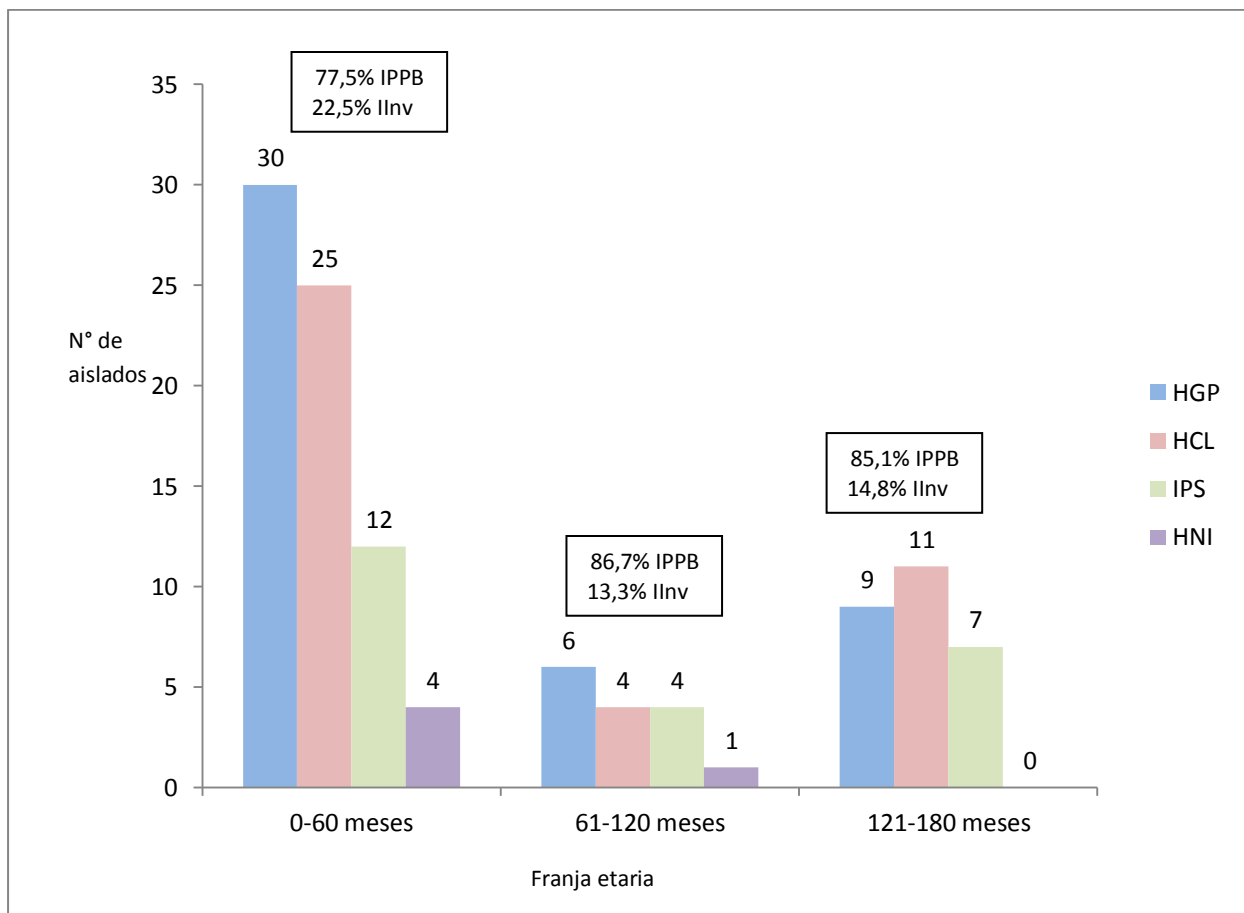


Figura 8. Distribución de aislados de *S. aureus* por hospital y franja etaria (n=113)

HGP: Hospital General Pediátrico; **HCL:** Hospital de Clínicas; **IPS:** Instituto de Previsión Social; **HNI:** Hospital Nacional de Itauguá; **IPPB:** Infecciones de piel y partes blandas; **IInv:** Infecciones Invasivas.

El 77,9% (n=88) de los niños de los cuáles provenían los aislados en estudio presentaron cuadros clínicos compatibles con infecciones de piel y partes blandas, mientras que se observaron con menor frecuencia cuadros clínicos graves como sepsis, osteomielitis y neumonía en el 22,1% (n=25). Se observó bacteriemia en el 18,6% de los niños (n=21).

Al analizar el tipo de infección ocasionada por *S. aureus* según la franja etaria del paciente se observó que en todos los grupos etarios, el mayor porcentaje de aislamientos causó infecciones de piel y partes blandas, con frecuencias de entre 77,5% y 86,7% (**Figura 8**).

Los aislados fueron colectados en el periodo de diciembre de 2009 a diciembre de 2010 y provenían de cuatro hospitales de referencia de Asunción y el Dpto. Central. La distribución de cepas por hospital incluyó: 45 aislados del Hospital General Pediátrico (HGP, 39,8%), 40 aislados del Hospital de Clínicas (HCL, 35,4%), 23 aislados del Instituto de Previsión Social (IPS, 20,4%) y 5 aislados del Hospital Nacional de Itauguá (HNI, 4,4%). Teniendo en cuenta los periodos estacionales analizamos la distribución de aislados por meses del año (**Figura 9**), observando que en el periodo estival correspondiente a diciembre a marzo se colectaron 76 aislados, que corresponden al 67,2 % del total de incluidos en este proyecto, el 82,9% (n=63) de éstos últimos provenían de muestras de infecciones de piel y partes blandas y el 17,1% (n=13) restantes de infecciones invasivas, más severas. Mientras que los meses caracterizados por presentar temperaturas más bajas presentaron un número menor de casos registrados: 32,7% (n=37), de los cuales el 75,7% (n=37) correspondían a muestras provenientes de infecciones de piel y partes blandas y el 24,3% (n=9) de cuadros más severos e invasivos. En ambos periodos, estival como no estival, se observó predominio de cuadros infecciosos localizados en piel y partes blandas.

El tipo de muestra biológica a partir de la cual se aisló *S. aureus* con más frecuencia fueron las secreciones purulentas que correspondieron al 77,9% (n=88), seguidas de otras muestras como: sangre 18,6% (n=21), huesos 2,6% (n=3) y líquido pleural 0,9% (n=1) (**Figura 10**).

4.1. Aislados de *S. aureus*

4.1.1. Susceptibilidad a antibióticos

La resistencia a meticilina fue detectada con los discos de oxacilina y cefoxitina como estipula el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). El fenotipo de resistencia a meticilina o sensibilidad a la misma fue corroborado por métodos moleculares, mediante la detección del gen que confiere resistencia a la misma. La concordancia entre fenotipo y genotipo fue del 100%, es decir, se detectó el gen que confiere resistencia a la meticilina en la totalidad de los SARM y no se observaron resultados positivos para éste en los aislados SASM. El perfil de susceptibilidad a antibióticos de los aislados se muestra en la **Tabla 7**.

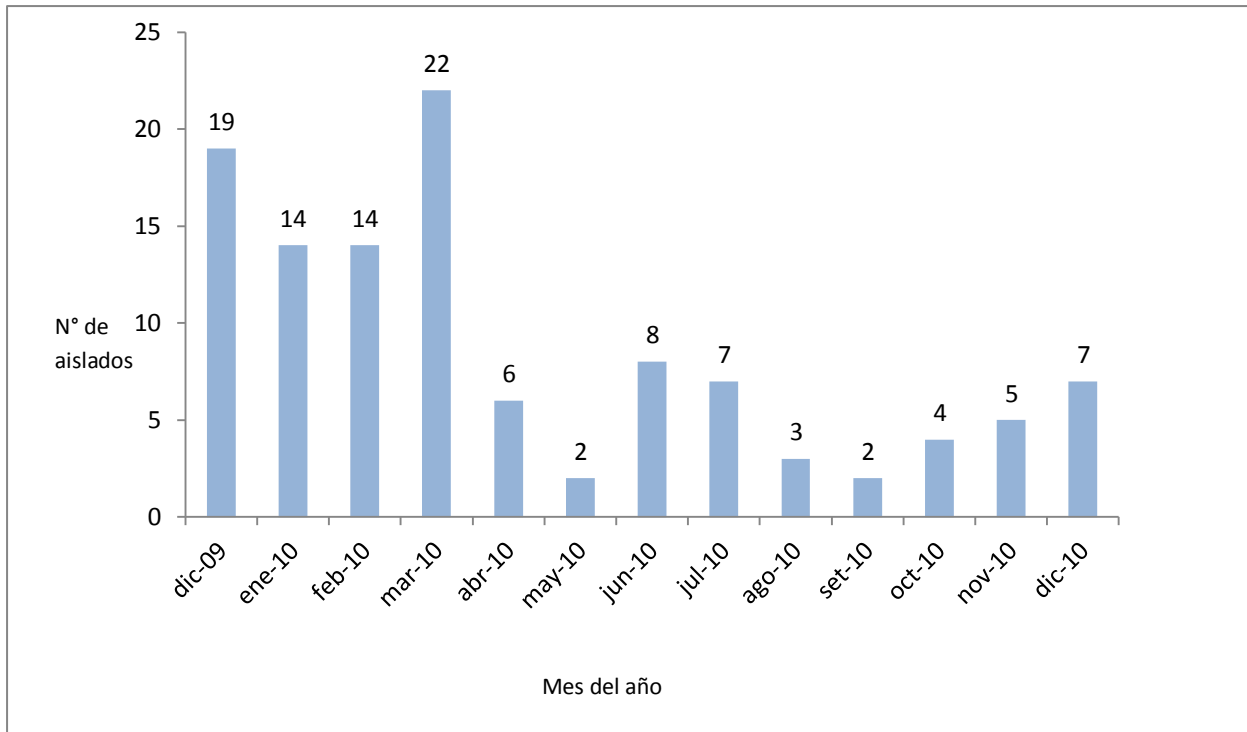


Figura 9. Número de aislados de *S. aureus* por hospital y mes de colecta (n=113). Se consideró como periodo estival el comprendido entre los meses de diciembre 2009 a marzo 2010 y diciembre 2010.

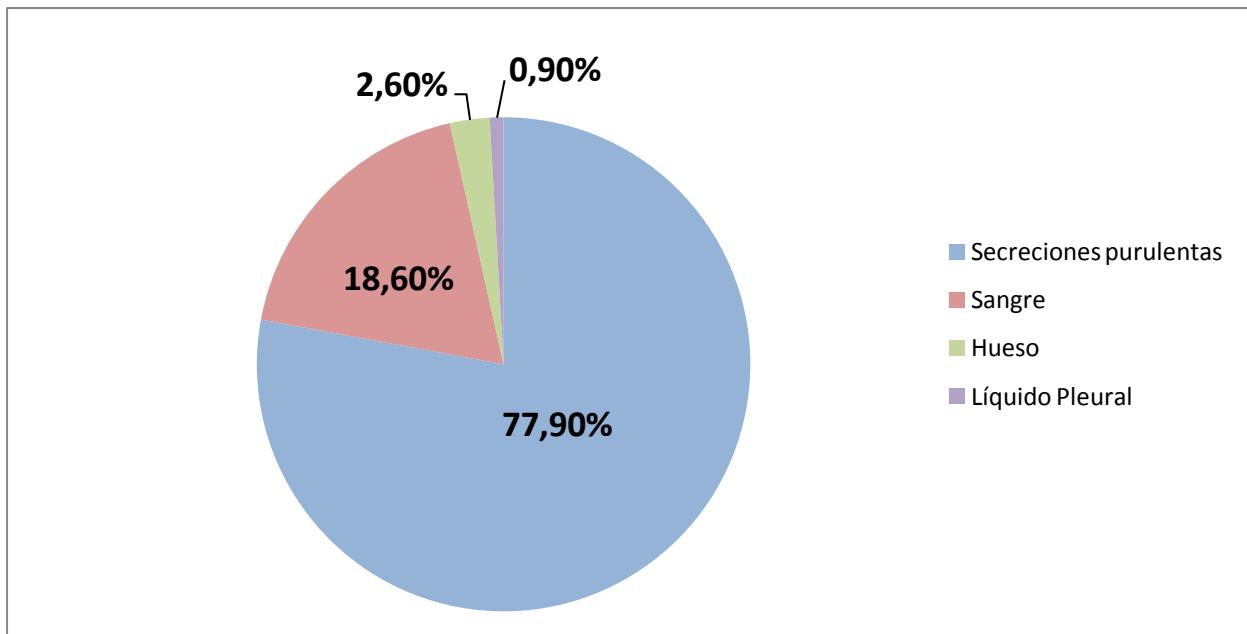


Figura 10. Origen de aislamientos de *S. aureus*

Tabla 7. Perfil de resistencia a antibióticos*

Antibiótico	TOTAL ^a		SARM ^b		SASM ^c		p ^e
	n	R ^d	N	R ^d	N	R ^d	
Penicilina	88	86 (97,7)	20	20 (100)	68	66 (97)	0,59508
Cloranfenicol	90	31 (34,4)	22	8 (36,4)	68	23 (33,8)	0,51036
Eritromicina	111	5 (4,5)	25	5 (20)	86	3 (3,5)	0,01387
Gentamicina	108	4 (3,7)	23	4 (17,4)	85	0 (0)	0,00165
Clindamicina	109	5 (4,6)	25	3 (12)	84	2 (2,4)	0,07817
Rifampicina	106	2 (1,9)	24	0 (0)	82	2 (2,5)	0,59676

*Los puntos de corte utilizados para la determinación de susceptibilidad antibiótica corresponden a los parámetros del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

^a n=113,

^b n=25,

^c n=88,

^d aislados resistentes, n (%),

^e Chi-cuadrado o Test exacto de Fisher según corresponda.

No se detectaron aislados de *S. aureus* resistentes a ciprofloxacina, vancomicina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina y teicoplanina, si bien cabe aclarar que dichos antibióticos fueron testados en 109 (96,5%), 105 (92,9%), 104 (92%), 99 (87,6%) y 93 (82,3%) del total de los aislados respectivamente, esto fue debido a diferencias en el esquema de antibiograma seguido por cada hospital participante del estudio. La susceptibilidad a novobiocina se testó en 76 (67,2%) de los aislados, con el fin de diferenciar al *S. aureus* del *S. saprophyticus*, observándose 100% de sensibilidad en los aislados y confirmando de esta manera su identidad. La susceptibilidad a penicilina se testó en 88 aislados, de los cuales el 97,7% (n=86) presentó fenotipo resistente. Cloranfenicol fue el segundo antibiótico con mayor porcentaje de resistencia, 34,4% (31/90). Los niveles de resistencia para clindamicina, eritromicina, gentamicina y

rifampicina no superaron el 5% de los aislados analizados. Comparando los perfiles de resistencia a antibióticos entre aislados SASM y SARM, se observaron niveles de resistencia a gentamicina y eritromicina mayores en SARM que en SASM, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$, Test Exacto de Fischer).

4.1.2. FACTORES DE VIRULENCIA

4.1.2.1. Estandarización de la técnica

El método de extracción simplificado y rápido de ADN, descrito por Zhang y colaboradores 2004 fue efectivo para la detección del gen *mecA* y los genes codificantes para los distintos factores de virulencia *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seh*, *hla*, *hlb*, *eta*, *etb* y *luk-PV* de *S. aureus*. Los aislados fueron identificados como *S. aureus* por medio de pruebas bioquímicas y amplificación de los genes codificante para el ARNr *16S* o *femb* específicos para *S. aureus*. La reacción de PCR con todos los oligonucleótidos dieron como resultado productos de amplificación de tamaño esperado (40,54).

4.1.2.2. Obtención de controles positivos

Un inconveniente importante al que nos enfrentamos fue el hecho de no contar con aislados previamente caracterizados como portadores de los genes codificantes de los distintos factores de virulencia para ser utilizados como controles positivos en las reacciones de amplificación en cadena de la polimerasa. Por lo anteriormente expuesto se realizó un screening de 259 aislados de *S. aureus* provenientes de un Biobanco de ADN del laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del IICS, entre los cuáles no estaban incluidos nuestros aislados en estudio, con el fin de encontrar aquellos aislados portadores de genes codificantes de factores de virulencia que produjeran productos de tamaño esperado y que puedan ser secuenciados para su confirmación (**Figura 11**). El análisis de las muestras del biobanco permitió detectar muestras de ADN que generaron productos de PCR con el tamaño esperado para todos los factores de virulencia

incluidos en este trabajo. Para confirmar la portación de dichos genes de virulencia se secuenció un producto representativo de cada gen (Macrogen, Corea). Se analizaron los electroferogramas con el software Bioedit 7.0.5.3 y las secuencias obtenidas fueron alineadas con las de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, EEUU) (**Figura 12**) mediante el uso del software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (**Figura 13**). Los alineamientos obtenidos para cada factor de virulencia se muestran en el **Anexo D** y los porcentajes de identidad de las secuencias de las cepas del biobanco y comparadas con las de la base de datos del NCBI se muestran en la **Tabla 8**.

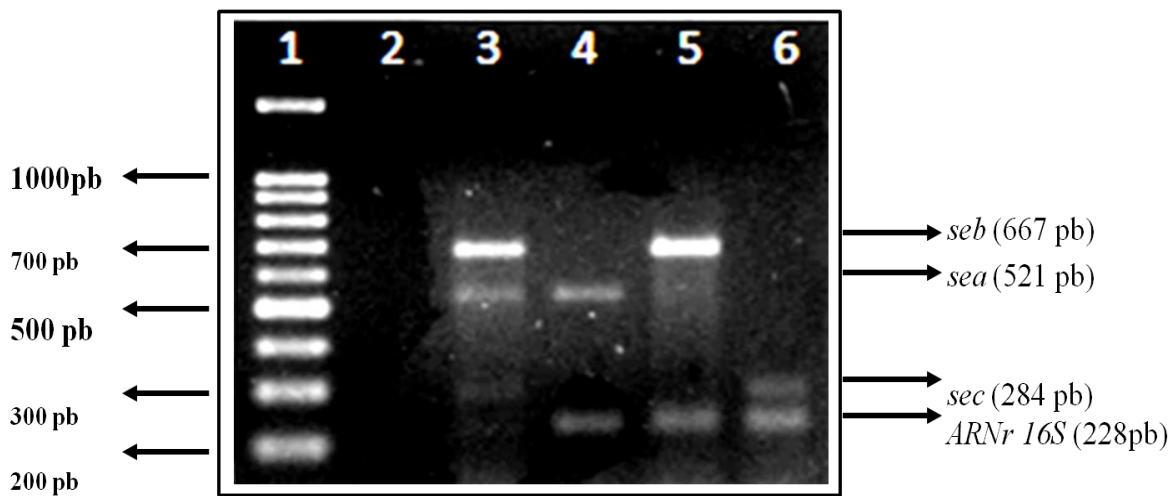


Figura 11. Screening del biobanco para detección simultánea de muestras portadoras de genes codificantes para enterotoxinas A, B, C y gen codificante del ARN ribosomal 16S, para ser utilizados como control positivo. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de los productos obtenidos por PCR múltiple. Tamaño productos: *sea* (521pb), *seb* (667 pb), *sec* (284 pb) y el control interno ADNr 16S (228pb). **Carriles:** **1)** marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas, EU); **2)** control negativo de amplificación; **3)** control positivo *sea, seb, sec*; **4)** muestra positiva gen *sea*; **5)** muestra positiva gen *seb* y **6)** muestra positiva gen *sec*. Todas las muestras de *S. aureus* dieron positivas para el gen codificante del ARNr 16S.

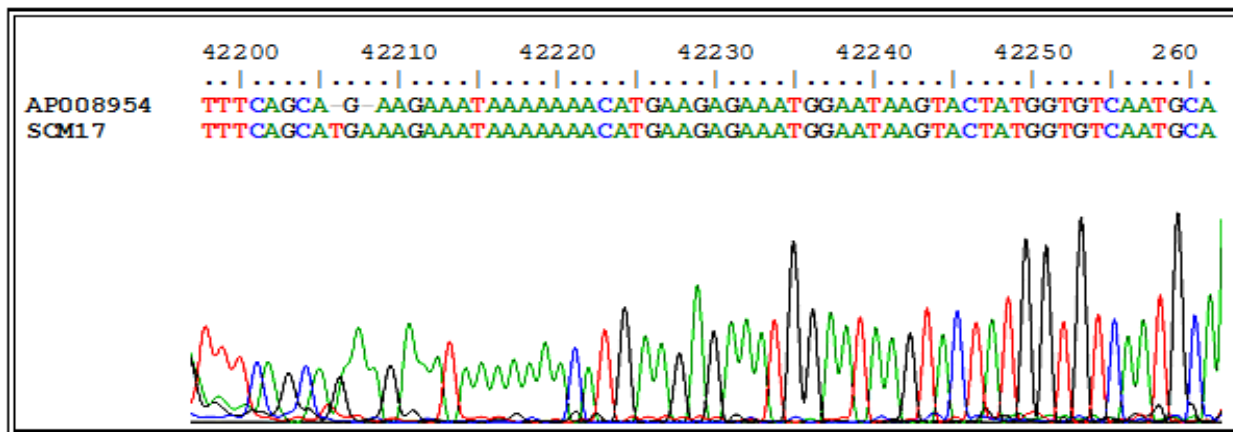


Figura 12. Alineamiento parcial de la secuencia del gen que codifica la toxina exfoliativa A. Se muestra el alineamiento parcial de la secuencia del gen que codifica la toxina exfoliativa A (*eta*), obtenida por amplificación utilizando oligonucleótidos específicos para detección del mismo a partir del aislado SCM 17 del biobanco, con la secuencia parcial del gen *eta* de la cepa *S. aureus* fago phiETA3 DNA: TY32 (AP008954) extraída de la base de datos del NCBI (EEUU) empleando el software BLAST, obteniéndose un 97% de similitud entre ambos. El electroferograma observado en la parte inferior de la figura corresponde a la secuencia del aislado SCM 17.

Una vez corroborada dicha secuencia y comparada con bases de datos reconocidas mundialmente, las cepas del biobanco que generaron productos de PCR con secuencias de identidad mayor o igual al 95% de identidad con las secuencias de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) fueron utilizadas como controles positivos en cada ronda de PCR (**Tabla 8**).

			10	20	30	40	50	60	
AY827552	134							193
SGP 70	4	GAATTGCAGGGAACAGCTTTAGGCAATCTTAAACAAATCTATTATTACAATGAAAAAGCT							63
			70	80	90	100	110	120	
AY827552	194							253
SGP 70	64	AAAAGTAAAAATAAGAGAGTCACGATCAATTTTACAGCATACTATATTGTTTAAAGGC							123
			130	140	150	160	170	180	
AY827552	254							313
SGP 70	124	TTTTTTACAGATCATTTCGTGGTATAACGATTTATTAGTAGATTTTGATTCAAAGGATATT							183
			190	200	210	220	230	240	
AY827552	314							373
SGP 70	184	GTTGATAAATATAAAGGGAAAAAGTAGACTTGTATGGTGCCTATTATGGTTATCAATGT							243
			250	260	270	280	290	300	
AY827552	374							433
SGP 70	244	GCGGGTGGTACACCAAACAAAACAGCTTGTATGTATGGTGGTGTAAACGTTACATGATAAT							303
			310	320	330	340	350	360	
AY827552	434							493
SGP 70	304	AATCGATTGACCGAAGAGAAAAAGTGCCGATCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAAAAT							363
			370	380	390	400	410	420	
AY827552	494							553
SGP 70	364	ACAGTACCTTTGGAAACGGTTAAAACGAATAAGAAAAATGTAAGTTCAGGAGTTGGAT							423
			430	440	450	460	470	480	
AY827552	554							612
SGP 70	424	CTTCAAGCAAGACGTTATTTACAGGAAAAATAAATTTATATAACTCTGATGTTTTTGAT							483
			490	500	510	520			
AY827552	613							641
SGP 70	484	GGG-AAGGTTTCAGAGGGG-ATTAATCGTGTTCATACTTCT							513

Figura 13. Alineamiento de la secuencia enterotoxina A. Se muestra el alineamiento completo realizado con una secuencia obtenida de la base de datos del NCBI (código de acceso: AY827552) y la secuencia del producto de PCR de la muestra SGP 70 del biobanco, empleando oligonucleótidos específicos para amplificación del gen que codifica la enterotoxina A (*sea*), cuyo tamaño esperado es de 521 pb. El alineamiento produjo un 99% de similitud.

Tabla 8. Comparación de secuencias de aislados seleccionados como controles positivos con base de datos del Genebank.

Aislado	Gen	Identidad (%) ^a	Cepa de comparación	Cód. acceso ^b
SGP 70	<i>sea</i>	99%	<i>S. aureus</i> sp <i>aureus</i> ST228 cód. 18341	AY827552
SGP 71	<i>seb</i>	99%	<i>S. aureus</i> IVM 10	AB860415
SIP 28	<i>sec</i>	99%	<i>S. aureus</i> sp <i>aureus</i> enterotoxin C1	AB860418
SIP 28	<i>sed</i>	95%	<i>S. aureus</i> sp <i>aureus</i> B1005, SED	KF007920
SGP 2	<i>seh</i>	99%	<i>S. aureus</i> , gen <i>seh</i> VI 50671	AJ937548
SGP 29	<i>hla</i>	96%	<i>S. aureus</i> ZS04	EF543163
SHN 67	<i>hlb</i>	100%	<i>S. aureus</i> BF-MV1	JN580071
SCM 17	<i>eta</i>	97%	<i>S. aureus</i> fago phiETA3	AP008953
SCM 50	<i>etb</i>	99%	<i>S. aureus</i> TY825	AP012467

^aidentidad obtenida con software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

^bcódigo de acceso a la secuencia en la base de datos del GeneBank

4.1.2.3. Frecuencia de factores de virulencia

La frecuencia global de portación de factores de virulencia se muestra en la **Tabla 9**. El gen de virulencia más frecuentemente detectado fue el codificante de la leucocidina de Pantón Valentine, *luk-PV*, presente en el 37,2% (n=42) de los aislados, seguido por las hemolisinas alfa 31,8% (n=36) y beta 8,8% (n=10) (**Figura 14**). Todos los aislados estudiados fueron fenotípicamente beta-hemolíticos. En menor porcentaje fueron detectadas la enterotoxina A y la toxina exfoliativa A ambas en 2,7 % (n=3) y la toxina exfoliativa B en dos aislados (1,8%) (**Figura 15**), mientras que las enterotoxinas B y H estuvieron presentes en un solo aislado (1%). No se detectaron aislados portadores de genes que codifican las enterotoxinas C y D. Del total de aislados, el 45,1% (n=51) no presentó los factores de virulencia analizados en este trabajo.

Tabla 9. Frecuencia de factores de virulencia detectados (n=113).

Gen	<i>luk-PV</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>seh</i>	<i>hla</i>	<i>hlb</i>	<i>eta</i>	<i>Etb</i>
<i>luk-PV*</i>	42									
<i>sea</i>	2	3								
<i>seb</i>	0	0	1							
<i>sec</i>	0	0	0	0						
<i>sed</i>	0	0	0	0	0					
<i>seh</i>	1	0	0	0	0	1				
<i>hla</i>	17	2	0	0	0	0	36			
<i>hlb</i>	7	0	0	0	0	0	10	10		
<i>eta</i>	1	1	0	0	0	0	2	0	3	
<i>etb</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	1	2

*los datos de portación del gen de *luk-PV* provenían de un estudio anterior.

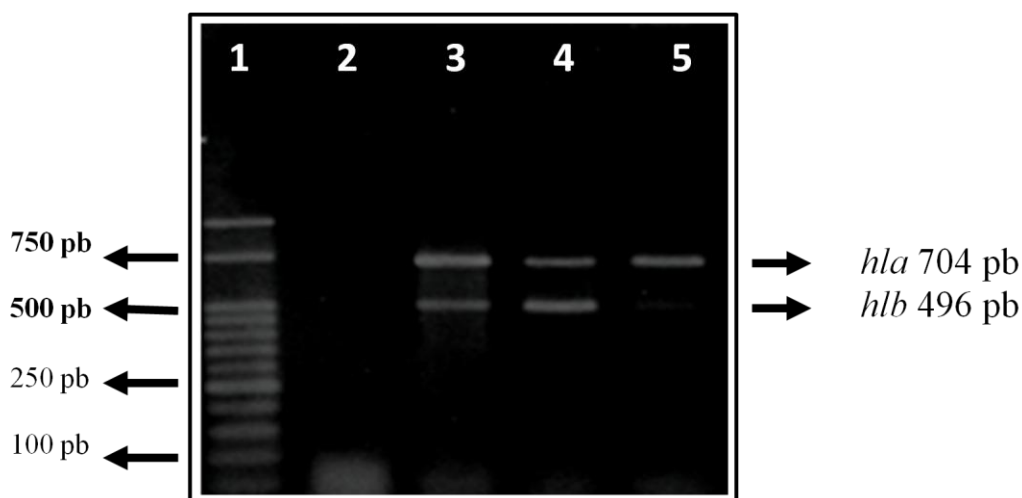


Figura 14. PCR múltiple para la detección de hemolisinas alfa y beta. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. **Carriles:** 1) marcador de peso molecular de 50 pb (Embiotec, Argentina); 2) control negativo; 3) control positivo para *hla* (704 pb) y *hla* (496 pb); 4) muestra positiva genes *hla* y *hla*; 5) muestra positiva gen *hla*.

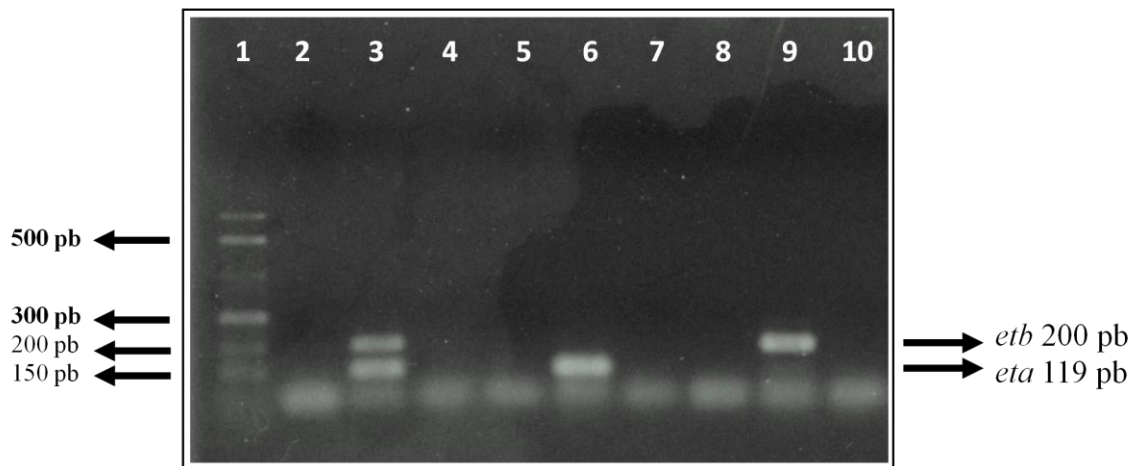


Figura 15. PCR múltiple para la detección de toxinas exfoliativas A y B. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. **Carriles:** 1) marcador de peso molecular de 50 pb (Bioron, Alemania); 2) control negativo; 3) control positivo para *eta* (119 pb) y *etb* (200 pb); 4, 5, 7, 8 y 10) muestras negativas; 6) muestra positiva *eta*; 9) muestra positiva *etb*.

4.3.2.3. Combinación de Factores de Virulencia

Además de la frecuencia global de portación de factores de virulencia, interesó conocer cómo éstos estaban agrupados, formando perfiles de virulencia diversos en los aislados estudiados. En la **tabla 10** se observan los perfiles de factores de virulencia encontrados. El perfil más frecuente fue la portación única del gen codificante para la leucocidina de Pantón Valentine, *luk-PV*, observada en un 37,1%, seguida por *hla* 19,4%, *luk-PV+hla* 14,5%, *luk-PV+hla+hlb* 11,3% y *hla+hlb* 4,9%. En menor porcentaje se presentaron otras combinaciones como: *luk-PV+seh*, *luk-PV+sea+hla*, *luk-PV+sea+eta*, *sea+hla*, *sea+hlb*, *hla+eta+etb*, *hla+eta*, *seb* todas en el 1,6%. Así mismo surgió el planteamiento sobre si la presencia de estos factores de virulencia detectados, podrían tener efecto sobre la gravedad del cuadro clínico del paciente del cual se aisló el *S. aureus*. Para analizar esta hipótesis se clasificaron a los aislados causantes de infecciones invasivas como a aquellos provenientes de cuadros graves como sepsis, osteomielitis y neumonía, y a los aislados causantes de menos graves como infecciones de piel y partes blandas. Al analizar la presencia de factores de virulencia en los aislados: leucodina, enterotoxinas, hemolisinas y toxinas exfoliativas con la gravedad del cuadro clínico: infecciones

de piel y partes blandas e infecciones invasivas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas variables, **tabla 11** ($p>0,05$ Chi-cuadrado o Test exacto de Fisher según correspondía).

Tabla 10. Perfil de factores de virulencia (n=62).

Combinación de genes	N° de aislados (%)
<i>luk-PV</i>	23 (37,1)
<i>Hla</i>	12 (19,4)
<i>luk-PV + hla</i>	9 (14,5)
<i>luk-PV + hla + hlb</i>	7 (11,3)
<i>hla + hlb</i>	3 (4,9)
<i>Seb</i>	1 (1,6)
<i>sea + hla</i>	1 (1,6)
<i>sea + hlb</i>	1 (1,6)
<i>hla + eta</i>	1 (1,6)
<i>hla + eta + etb</i>	1 (1,6)
<i>luk-PV + seh</i>	1 (1,6)
<i>luk-PV + sea + hla</i>	1 (1,6)
<i>luk-PV + sea + eta</i>	1 (1,6)
TOTAL	62 (100)

Tabla 11. Frecuencia de factores de virulencia con respecto al cuadro clínico del paciente

TOXINAS	CUADRO CLÍNICO		p ^c
	Infecciones PIEL y PARTES BLANDAS ^a (n=92)	Infecciones INVASIVAS ^b (n=21)	
Leucocidina	40 (37)	24 (5)	0,16
Enterotoxinas	3 (3)	10 (2)	0,21
Hemolisinas	29 (27)	43 (9)	0,23
Exfoliativas	2 (2)	10 (2)	0,16

^avalor expresado en porcentaje (%), respecto a n=92.

^bvalor expresado en porcentaje (%), respecto a n=21.

^c Chi-cuadrado o Test exacto de Fisher según corresponda.

Se analizó también la frecuencia de portación de genes codificantes para los distintos factores de virulencia estudiados en aislados sensibles y resistentes a meticilina. Se observó mayor frecuencia de portación de genes codificantes para las leucocidina de Pantón Valentine, enterotoxinas A y hemolisinas alfa y beta en aislados SARM en comparación a los SASM. No se detectaron aislados SARM portadores de genes *seb*, *seh*, *eta* y *etb*, aunque sí fueron detectados en los SASM en frecuencias menores a 5% (**Tabla 12**). Las diferencias observadas en las frecuencias de factores de virulencia registradas entre los aislados SASM y SARM no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$ Chi-cuadrado o Test exacto de Fisher según correspondía).

Tabla 12. Factores de virulencia en aislados SASM y SARM

	Factores de Virulencia		p ^c
	SASM ^a	SARM ^b	
Leucocidina de Pantón Valentine	31 (35,2)	11 (42,3)	0,64
Enterotoxinas A	2 (2,3)	1 (3,8)	0,53
Enterotoxinas B	1 (1,1)	0 (0)	0,78
Enterotoxinas H	1 (1,1)	0 (0)	0,78
Hemolisinas A	27 (30,7)	9 (34,6)	0,25
Hemolisinas B	7 (7,9)	3 (11,5)	0,39
Toxinas exfoliativas A	3 (3,4)	0 (0)	0,47
Toxinas exfoliativas B	2 (2,3)	0 (0)	0,60

^an=88, correspondiente al 77,9% del total de aislados,

^bn=25, correspondiente al 22,1% del total de aislados,

^c Chi-cuadrado o Test exacto de Fisher según corresponda.

Al analizar los aislados según susceptibilidad a meticilina, cuadro clínico producido y portación de factores de virulencia encontramos los siguientes resultados (**Tabla 13**): entre los 8 aislados SARM caracterizados que produjeron cuadros clínicos invasivos, el 75% portaron los factores de virulencia de manera individual o combinada a otro factor: PVL 37,5%, hIA 25% y hIB 12,5%. Entre los 88 aislados SASM caracterizados, sólo el 14% (n=13) produjo infecciones invasivas y el resto (86%) infecciones de piel y partes blandas. De entre los 13 aislados SASM que produjeron infecciones invasivas, sólo 5 (38%) aislados no portaron ningún factor de virulencia y los demás (n=8) portaron factores de virulencia individuales o asociados (PVL:38%, hemolisina A: 75%, hemolisina B: 13%, toxina exfoliativa A:13%, toxina exfoliativa B: 13%, enterotoxina A: 13% y enterotoxina B: 13%). El 50% (n=8) de los aislados responsables de causar infecciones invasivas fueron portadores de por lo menos un factor de virulencia, llegando

incluso a registrarse 2 (12,5%) aislados que presentaron portación simultánea de genes codificantes para la PVL, hemolisina A y B. Entre el 25 al 33% de los aislados *S. aureus* portadores de los genes *luk-PV+hla+hlb* produjo infecciones invasivas independientemente del hecho de ser SARM o SARM.

Tabla 13. Perfil de factores de virulencia según susceptibilidad a meticilina y tipo de cuadro clínico que ocasionaron (n=113).

Genes	SARM (n=25)		SASM (n=88)	
	CUADRO CLÍNICO			
	Infecciones Severas 32 ^a (n=8)	IPPB 68 (n=17)	Infecciones Severas 14 (n=13)	IPPB 86 (n=75)
ND*	12 (3)	28 (7)	6 (5)	41 (36)
<i>luk-PV</i>	8 (2)	16 (4)	1 (1)	18 (16)
<i>hla</i>	8 (2)	8 (2)	2 (2)	7 (6)
<i>luk-PV + hla</i>	0 (0)	4 (1)	0 (0)	9 (8)
<i>luk-PV + hla + hlb</i>	4 (1)	8 (2)	1 (1)	4 (3)
<i>hla + hlb</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (3)
<i>luk-PV + sea + hla</i>	0 (0)	4 (1)	0 (0)	0 (0)
<i>luk-PV + sea + eta</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
<i>hla + eta + etb</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
<i>hla + eta</i>	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
<i>hla + etb</i>	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
<i>sea + hla</i>	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
<i>luk-PV + seh</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
<i>seb</i>	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)

*ND: No se detectó genes codificantes de factores de virulencia en estos aislados

^aLos números fuera del paréntesis están expresados en porcentaje (%)

4.4. ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA. MLVA

4.4.1. Amplificación de los 7 locus

4.4.1.1. Ajuste de condiciones de PCR simple

Previa a la puesta a punto de la amplificación múltiple, se realizaron primero reacciones de PCR individuales con cada uno de los 5 pares de oligonucleótidos, con las 4 cepas elegidas, empleando las condiciones descritas en la publicación original del cual se extrajo el diseño de los oligonucleótidos (39). Las condiciones de reacción de las PCR individuales como concentraciones de buffer, dNTPs, oligonucleótidos, MgCl₂ fueron modificadas hasta que todas dieron como resultado productos amplificados para cada locus. En el caso de la técnica de MLVA, se espera que el tamaño de los productos varíe ligeramente dentro de un rango esperado en caso de tratarse de aislados diferentes, debido a que entre éstos se diferencian por la cantidad de repeticiones de los VNTR.

Una vez que todas las reacciones de PCR individuales generaron productos amplificados, se procedió a realizar la PCR múltiple con las mismas 4 cepas elegidas.

4.4.1.2. Ajuste de condiciones de la PCR múltiple

Al emplear las 5 parejas de oligonucleótidos en una sola reacción se observó la falta de amplificación de algunos locus, por lo que se hicieron pruebas de diversas condiciones de reacción hasta conseguir aquellas óptimas. Una de las modificaciones más importantes consistió en la necesidad de realizar la extracción del ADN empleando un kit comercial, que permitió obtener un mejor grado de purificación que aquel generado en muestras extraídas por ebullición, con lo que se obtenían amplificaciones parciales. La amplificación óptima por PCR múltiple se observó empleando como molde una concentración de 40 ng de ADN.

Otra de las modificaciones realizadas fue la disminución en la concentración del buffer en la mezcla final de reacción múltiple y la temperatura de reacción en el proceso de anillamiento de

los oligonucleótidos. Para la optimización de la reacción múltiple fue necesaria además la adición de un mejorador de reacción, DMSO (dimetilsulfóxido) al 5% a la mezcla final de reacción. Los reactivos utilizados y sus concentraciones finales optimizadas para la reacción de PCR múltiple empleada en la técnica MLVA fueron las descritas en el apartado de **materiales y métodos**.

4.4.2. Reproducibilidad de las reacciones de amplificación y de la separación de los fragmentos de ADN

Para comprobar la reproducibilidad de las reacciones de PCR múltiple de la técnica MLVA se incluyó la cepa *S. aureus* ATCC ® 29213 (*mecA* negativo y productor de una β -lactamasa débil) en cada ronda de amplificación de tal forma a verificar la amplificación de cada una de las siete bandas esperadas en cada reacción. En total se amplificó siete veces el ADN de esta cepa en distintas reacciones, en todas las ocasiones la reacción fue completa, observándose amplificación de las siete bandas esperadas.

Para el análisis de los productos de PCR obtenidos en la técnica MLVA se probó realizar la electroforesis en gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio, como indicaba la publicación original, pero la resolución de los fragmentos en la corrida electroforética y la sensibilidad de la tinción no fueron suficientes como para observar todas las bandas de los fragmentos de ADN generados en la amplificación. Por lo que se realizó la separación de los fragmentos de ADN por electroforesis en gel de poliacrilamida como indica en el apartado de **materiales y métodos**, y posterior a eso se procedió a la digitalización de los mismos para obtener el tamaño de las bandas.

Para estimar un rango probable de tamaños de productos amplificados para cada locus realizamos un análisis bioinformático empleando el software BLAST para el alineamiento de los oligonucleótidos utilizados con cepas de referencia obtenidas de la base de datos del GeneBank:

NRS 100, 502A, USA 300-ISMMMS1 y Z172. Con los resultados obtenidos se elaboraron los rangos de tamaño que figuran en la **tabla 14**. Los productos amplificados en las 11 cepas y en la cepa *S. aureus* ATCC ® 29213 tenían tamaños congruentes con el rango estimado para cada locus.

Para verificar la reproducibilidad del tamaño de los productos MLVA se emplearon los datos de tamaños de productos obtenidos en las amplificaciones repetitivas (n=7) de la cepa *S. aureus* ATCC ® 29213. Con los valores obtenidos se calculó la media y el desvío estándar del tamaño de cada producto. El valor medio de cada uno de los amplicones de la cepa *S. aureus* ATCC ® 29213 se encontró dentro del rango de tamaños esperados y se observaron variaciones de entre el 2,8 y 18,2% entre mediciones. Las desviaciones más acentuadas se observaron en aquellas bandas de menor tamaño y que presentaron mayor migración en el gel de poliacrilamida. Sin embargo las variaciones en la movilidad electroforética no tuvieron efecto en la agrupación, porque ésta se observó de la misma forma en todos los amplicones dentro de un mismo gel.

Tabla 14. Análisis de reproducibilidad en la separación de fragmentos de ADN

Locus	Rango tamaño (pb) estimado	Media ± DS SAU 29213 (n=7)	% Variación
<i>ClfA</i>	1182-996	1018 ± 79	7,8%
<i>ClfB</i>	995-805	796 ± 22	2,8%
<i>SdrCDE</i>	747-699	712 ± 24	3,4%
<i>SdrCDE</i>	651-615	612 ± 63	10,3%
<i>SdrCDE</i>	603-573	502 ± 56	11,1%
<i>SpA</i>	350-283	308 ± 56	18,2%
<i>SspA</i>	154-208	173 ± 21	12,1%

4.4.3. Obtención y reproducibilidad del dendograma

Para la obtención del dendograma se analizaron varios softwares que realizaran esta función, el software elegido fue el Treeview versión X 0.5.1., por ser versátil, fácil de utilizar y arrojar dendogramas simples y de fácil interpretación.

Para el análisis de la reproducibilidad del dendograma, se repitió tres veces la reacción de amplificación del ADN, electroforesis en gel de poliacrilamida, digitalización del gel y dendograma empleando los mismos 11 aislados LSAU, seleccionados por poseer los datos de caracterización por técnicas moleculares como: tipificación del *cassette SCCmec*, *locus SpA* y secuenciotipo por MLST. En este proceso los primeros dos dendogramas fueron exactamente iguales (**Figura 16.B.1**), pero en el tercero (**Figura 16.B.2**) los aislados analizados no fueron agrupados exactamente de la misma forma: del total de los 11 aislados, 4 de ellos terminaron asignados en agrupamientos distintos de los obtenidos en los dos experimentos anteriores. Al observar el gel de poliacrilamida que generó esta variación se notó la existencia de bandas en la sección izquierda del gel que presentan defectos debido a fallos en el proceso de electroforesis (**Figura 16.A.2**), motivo por el cual se observan incongruencias en los dendogramas. Por ello, se escogieron los dos primeros experimentos para comparar los resultados obtenidos por la metodología MLVA con las demás metodologías de tipificación y poder validarla.

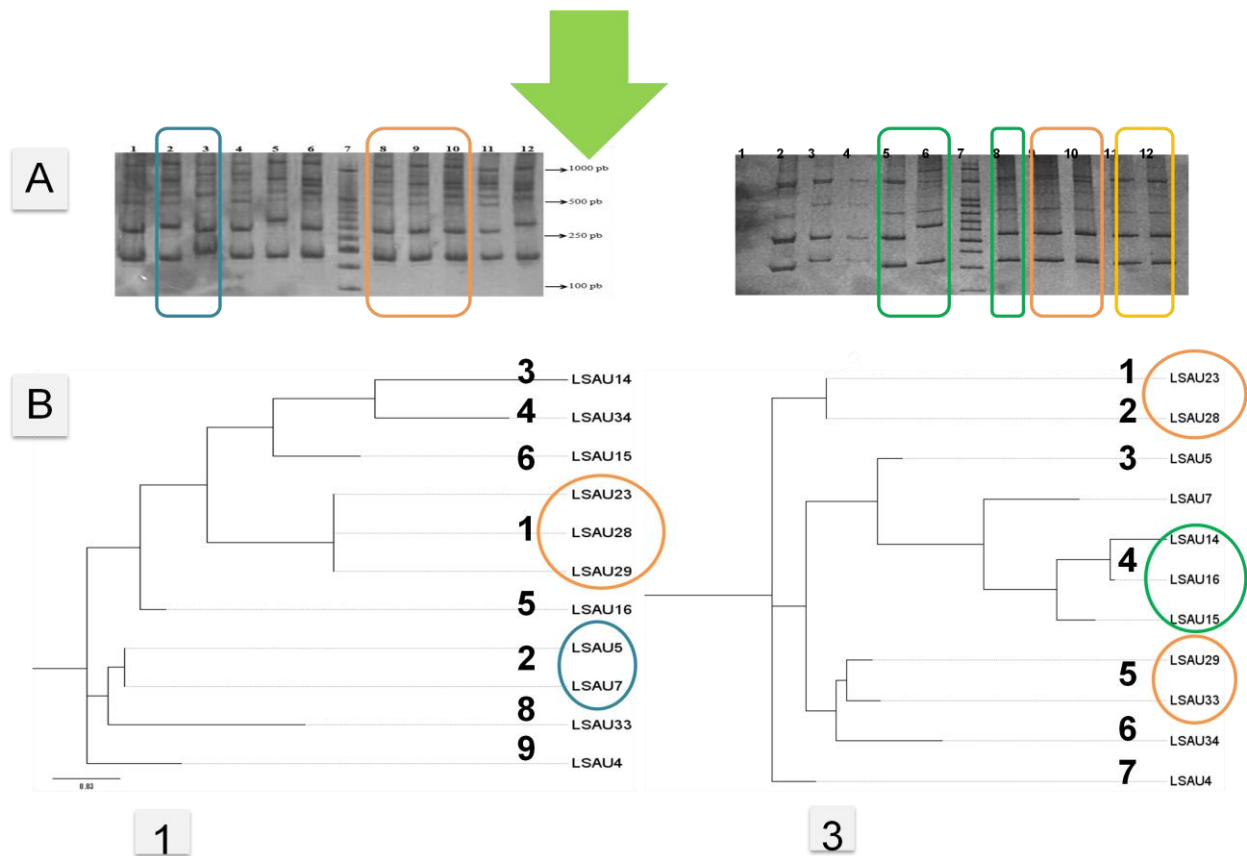


Figura 16. Análisis de reproducibilidad de dendrograma empleando la técnica MLVA. A) Geles de Poliacrilamida al 7,5% con tinción de Nitrato de Plata de los once aislados previamente genotipificados y empleados a modo de referencia. Se observa el patrón de bandas obtenido por amplificación múltiple MLVA por triplicado (en esta figura sólo se observan dos geles, el primero y el tercero, ya que el segundo gel y su correspondiente dendrograma fueron idénticos al primero), A.1.Carriles: 1)LSAU4, 2)LSAU5, 3)LSAU7, 4)LSAU14, 5)LSAU15, 6)LSAU16, 7)Marcador de pesos moleculares de 100pb, 8)LSAU23, 9)LSAU28, 10)LSAU29, 11)LSAU33, 12)LSAU34. A.2.Ídem A.1. A.3.Carriles: 1) Control negativo 2)LSAU4, 3)LSAU5, 4)LSAU7, 5)LSAU14, 6)LSAU15, 7)Marcador de pesos moleculares de 100pb, 8)LSAU16, 9)LSAU23, 10)LSAU28, 11)LSAU29, 12)LSAU33. B) Dendrograma obtenido con Treeview X 0.5.1 de los geles A.1. y A.3. En el dendrograma B.1 se visualizan 8 perfiles MLVA diferentes agrupados: el agrupamiento 1 abarca 3 aislados idénticos: LSAU23, 28 y 29; 2 agrupa 2 aislados idénticos: LSAU 5 y LSAU 7, y los demás agrupamientos abarcan aislados con perfiles distintos: 4: LSAU15, 7: LSAU 4, 5: LSAU16, 8: LSAU33, 6: LSAU34 y 3: LSAU14. Dendrograma B.2 Ídem B.1. Dendrograma B.3. Se visualizan 7 perfiles MLVA diferentes agrupados de la siguiente manera: el agrupamiento 1 abarca 2 aislados idénticos: LSAU23 y LSAU28; 4 agrupa a 3 aislados que no difieren en más de una banda: LSAU7, LSAU15 y LSAU16, el 5 agrupa a dos aislados similares LSAU29 y LSAU33 y las demás agrupaciones abarcan aislados distintos: 7: LSAU4, 2: LSAU5, 3: LSAU14, 6: LSAU34.

En la **tabla 15** podemos observar que 7/11 aislados se agrupan de la misma manera en las 3 ocasiones que se repitió en proceso de reproducibilidad, y los 4/11 aislados restantes se agrupan de la misma forma en 2/3 dendogramas realizados en dicho análisis.

Tabla 15. Agrupaciones de los aislados analizados en el análisis de reproducibilidad del dendograma

CEPAS (n=11)	DENDOGRAMA		
	Primero (Fig. 13.B.1)	Segundo(Fig. 13.B.1)	Tercero(Fig. 13.B.3)
LSAU 4	7	7	7
LSAU 5	2	2	2
LSAU 7	2	2	4
LSAU 14	3	3	3
LSAU 15	4	4	4
LSAU 16	5	5	4
LSAU 23	1	1	1
LSAU 28	1	1	1
LSAU 29	1	1	5
LSAU 33	8	8	5
LSAU 34	6	6	6

4.4.4. Comparación con PFGE, tipificación del *cassette SCCmec*, *locus spa* y MLST

Al estandarizar la metodología MLVA con los aislados previamente tipificados por PFGE, *cassette SCCmec*, *locus spa* y MLST, se pudieron comparar los resultados obtenidos en los dos primeros experimentos por la metodología MLVA con los demás métodos de referencia para poder validarla (**Figura 17**). La MLVA organizó los once aislados en 8 agrupaciones, 6 de ellos agruparon un sólo aislado (3, 4, 5, 6, 7 y 8), mientras que las agrupaciones 1 y 2 abarcaron tres y dos aislados respectivamente. La agrupación **1** abarcó los aislados: LSAU23, LSAU 28 y LSAU29, teniendo todos los mismos tipos de *cassette SCCmec*, *spa* y secuenciotipo (ST), pero variaron en el resultado de la PFGE. La agrupación **2** abarcó a 2 aislados LSAU5 y LSAU7 (C9, IVNv, 2, ST100), con las mismas características identificadas por todas las metodologías moleculares.

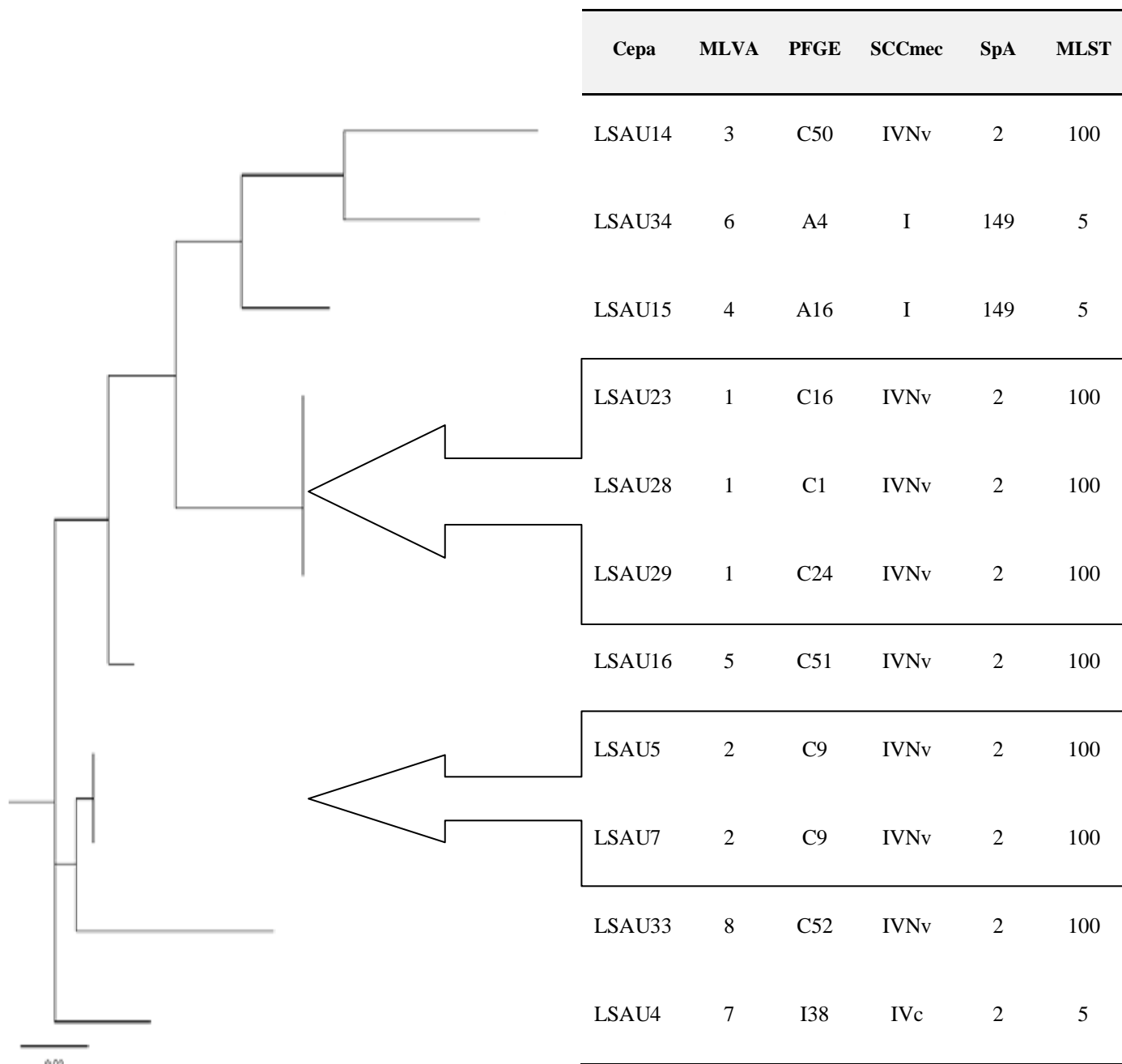


Figura 17: Comparación con PFGE, tipificación del *cassette SCCmec*, locus *spa* y MLST. A la izquierda de la figura se observa el dendrograma obtenido con la técnica MLVA y a la derecha los resultados de la caracterización de las mismas cepas por PFGE, tipificación del *cassette SCCmec*, del locus *spa* y MLST.

4.4.5. Análisis MLVA de los aislados en estudio

Se logró amplificar el total de los 7 locus en 112 (99%) aislados de los 113 estudiados. En tan sólo uno de los aislados se observó una amplificación parcial de 5 de los 7 locus analizados por la metodología MLVA, a pesar de la repetición de la técnica y confirmación de la calidad del ADN.

El dendograma integrado de los 112 aislados restantes en los que se obtuvo la amplificación completa de los locus MLVA reveló 105 perfiles MLVA diferentes (**Figura 18**), en su mayoría compuestos por aislados únicos denotando gran variabilidad. Se observaron sólo 5 agrupaciones identificadas como: 4, 11, 39, 54 y 90, que englobaron a más de un aislado, los mismos generaron el mismo patrón de bandas ó hasta una banda de diferencia (**Tabla 16**). Los demás aislados (n=100) presentaron todos perfiles distintos.

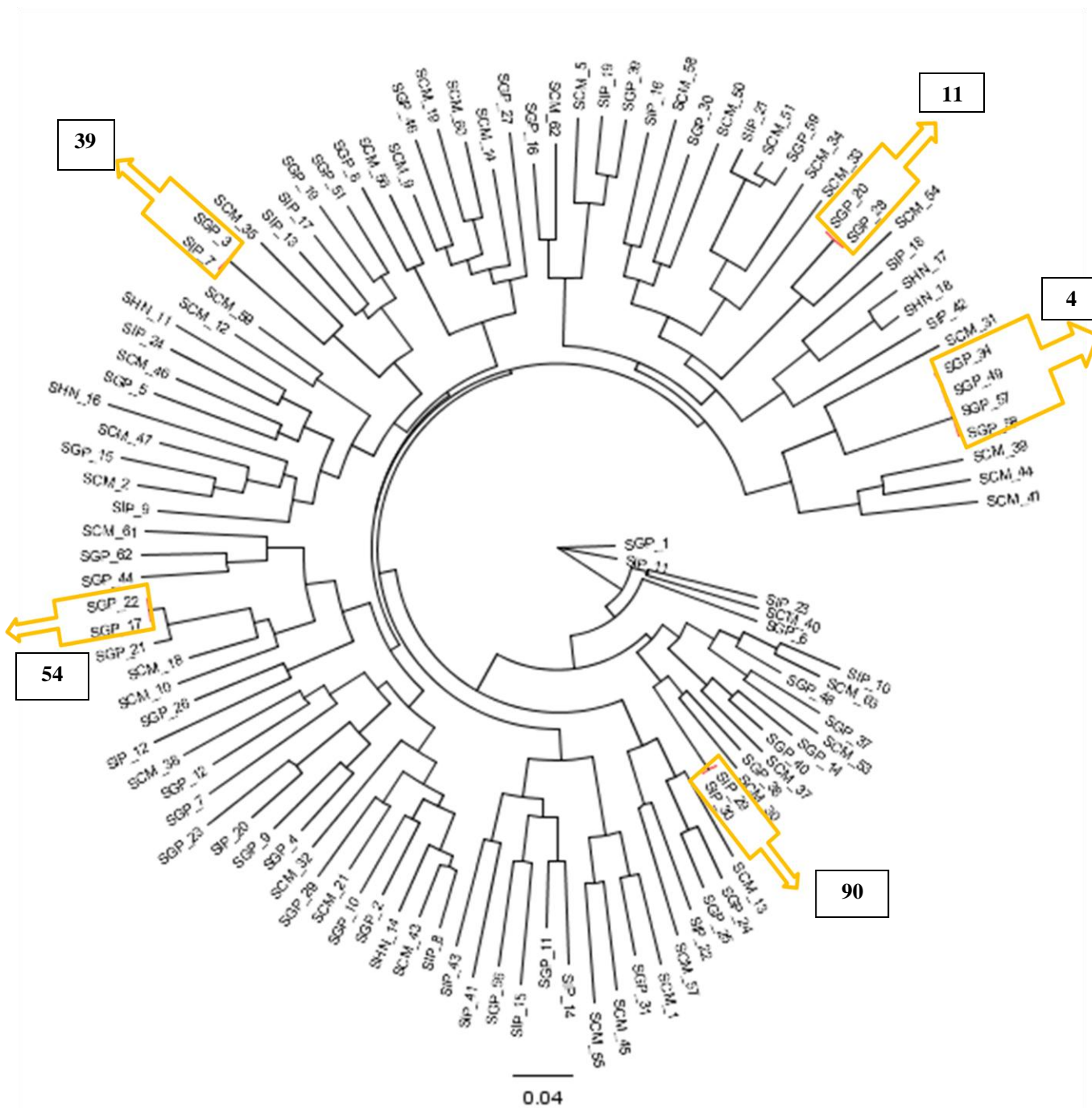


Figura 18: Dendrograma de todos los aislados (n=112). Se observan los 105 perfiles MLVA diferentes, de los cuáles 5 engloban a más de un aislado: 4, 11, 39, 54 y 90, nombrados en orden numérico.

La agrupación **4** abarcó a los siguientes aislados: SGP 34, SGP 49, SGP 57 y SGP 58. Todos estos aislados provenían de un mismo nosocomio, causaron infecciones de piel y partes blandas y fueron obtenidos en un periodo de 8 meses. El perfil de susceptibilidad antimicrobiana fue igual para todos, sin embargo sólo dos de ellos eran portadores del gen codificante de la PVL (**Tabla 16**).

Las agrupaciones **11** y **54** abarcaron a dos aislados cada uno: SGP 20, SGP28 y SGP 17, SGP 22 respectivamente. Así como en el agrupamiento anterior, todos estos aislados provenían del mismo hospital y causaron infecciones de piel y partes blandas. Los aislados de la agrupación **11** fueron aislados en un lapso de 28 días entre uno y otro, mientras que entre los aislados de la agrupación **54** sólo hubo 11 días de diferencia entre ambas recolecciones. En ambos casos los aislados tenían las mismas características fenotípicas y genotípicas (**Tabla 16**).

En la agrupación **39** se incluyeron los aislados: SIP 7 y SGP 3, provenientes de nosocomios diferentes. Ambos causaron de infecciones de piel y partes blandas, fueron aislados con sólo una semana de diferencia y compartían el mismo fenotipo y genotipo, tanto en cuanto al perfil de susceptibilidad antimicrobiana (SASM), así como la ausencia de factores de virulencia analizados en este estudio (**Tabla 16**).

La agrupación **90**, los aislados: SIP 29 y SIP 30, ambos del mismo nosocomio. El aislado SIP29 causó infección invasiva, mientras que el SIP30 produjo infección de piel. Ambos fueron aislados el mismo día y compartían tanto el mismo antibiotipo como mismo perfil de virulencia, ya que son portadores de los genes codificantes de PVL y hemolisinas alfa y beta (**Tabla 16**).

Tabla 16: Características de los aislados agrupados por la metodología MLVA

Agrupación MLVA	Aislados	Fecha aislamiento	Susceptibilidad a antibióticos	Factores de Virulencia	Tipo de muestra
4	SGP 34	10/03/10	metiR ¹ , TS ² , peniR ³	Ninguno	Invasiva
	SGP 49	04/06/10	metiR, TS, peniR	PVL	IPPB
	SGP 57	07/09/10	metiR, TS, peniR	Ninguno	IPPB
	SGP 58	09/11/10	metiR, TS, peniR	PVL	IPPB
11	SGP 20	10/02/10	metiS, TS, peniR	PVL ⁴	IPPB ⁵
	SGP 28	09/03/10	metiS, TS, peniR	PVL	IPPB
39	SIP 7	10/12/09	metiS, TS, peniR	Ninguno	IPPB
	SGP 3	17/12/09	metiS, TS, peniR	Ninguno	IPPB
54	SGP 17	21/01/10	metiR, TS, peniR	PVL	IPPB
	SGP 22	10/01/10	metiR, TS, peniR	PVL	IPPB
90	SIP 29	19/03/10	metiR, TS, peniR	PVL, hIA ⁶ , hIB ⁷	Invasiva
	SIP 30	19/03/10	metiR, TS, peniR	PVL, hIA, hIB	IPPB

¹metiS: sensible a meticilina ó metiR: resistente a meticilina

²TS: Todo Sensible: Vancomicina, Clindamicina, Teicoplanina, Eritromicina, Gentamicina, Cloramfenicol, Tetraciclina, Rifampicina, Ciprofloxacina, Trimetoprim-Sulfametoxazol.

³peniS: sensible a penicilina ó peniR: resistente a penicilina

⁴PVL: portador del gen que codifica la Leucocidina de Pantón Valentine

⁵IPPB: Infecciones de piel y partes blandas

⁶hIA: portador del gen que codifica la hemolisina A

⁷hIB: portador del gen que codifica la hemolisina B

Por otra parte el análisis de forma puntual de los perfiles MLVA de los aislados SARM se muestra en la **Figura 19**. En este dendograma se observan tres agrupamientos denominados 5, 7 y 14, que corresponden a los agrupamientos 54, 4 y 90 de la **Figura 18** respectivamente. Por tanto, del total de 4 agrupamientos detectados en 1 año, 3 de ellos corresponden a aislados SARM.

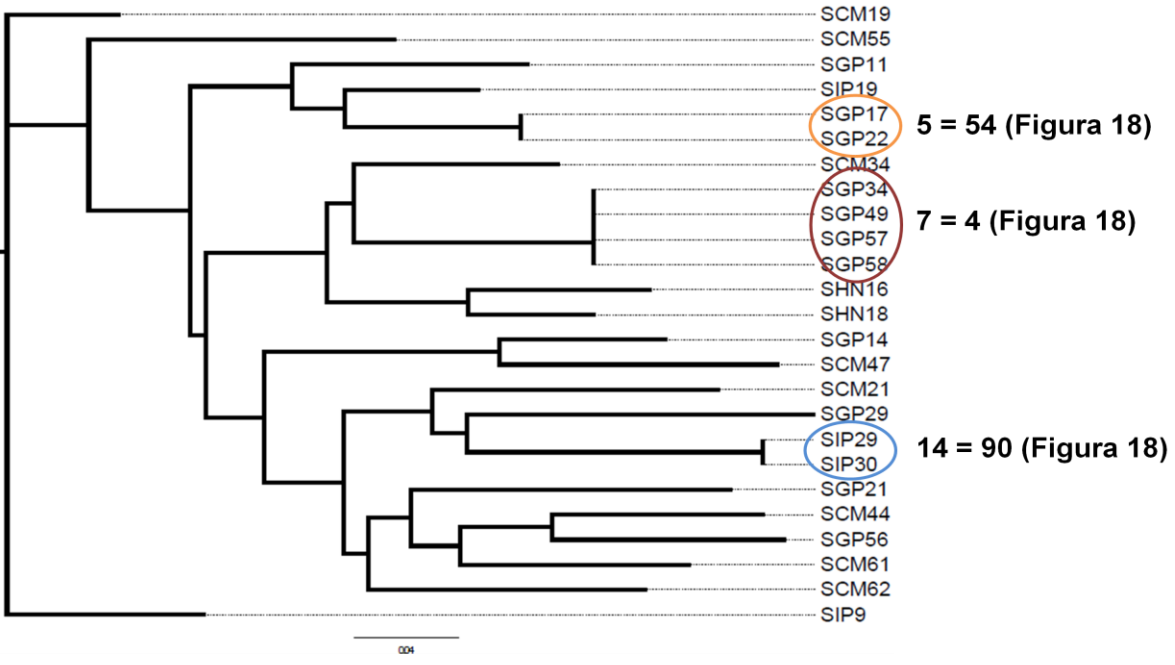


Figura 19. Dendrograma de los aislados SARM (n=25). Se observan tres agrupaciones: 5, 7 y 14, conteniendo los mismos aislados que fueron agrupados en el dendrograma general con los 112 aislados, correspondiendo a agrupamientos 54, 4 y 90 de la **Figura 18** respectivamente.

Teniendo en cuenta los perfiles MLVA de los aislados que produjeron cuadros graves como: sepsis, osteomielitis y neumonía, se observó una elevada variabilidad como se muestra en la **Figura 20.**

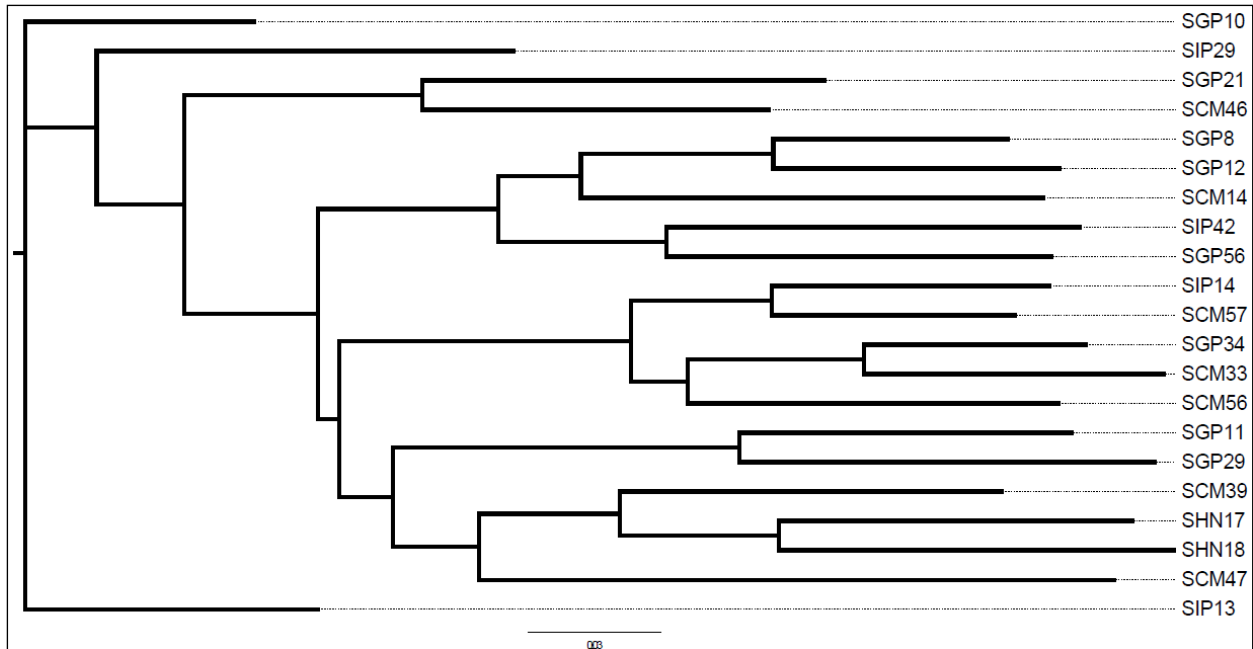


Figura 20. Dendrograma de aislados de *S. aureus* provenientes de cuadros clínicos graves: sepsis, osteomielitis y neumonía (n=21).

5. Discusión

5.1. Características clínicas y demográficas de niños con infecciones por *S. aureus*

En este trabajo se han analizado 113 aislados de *S. aureus* provenientes de niños que concurren a 4 hospitales de referencia de Asunción y el departamento Central en el año 2010. Este número de muestras cumple el tamaño de muestras calculado para el estudio, así como supera a algunas publicaciones internacionales, como la de Sauer que en el 2008 analizó la presencia de 13 genes codificantes de factores de virulencia (*tst, pvl, eta, etb, sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei y sej*) en 100 aislados de SARM colectados de todo tipo de muestras infecciosas de pacientes adultos, tanto de mujeres (57%) como hombres (43%), con una media de edad de 51 años (rango de 21 a 84 años) (9). Collery en el mismo año también publicó un análisis de 48 aislados colectados de hisopados nasales de niños sanos sometidos a screening de 16 genes codificantes de factores de virulencia (*sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, selj, selk, sell, selm, seln, selo, selq, tst*), y tipificación por la técnica MLVA (11). En este estudio, al igual que en los mencionados recientemente, no se observaron diferencias significativas en la distribución por género/sexo de los niños cuyos aislados fueron incluidos.

El mayor porcentaje de aislamientos de *S. aureus* se registró en pacientes de entre 0 a 60 meses de edad, correspondiente al 62,8% (n=71) de los aislados en estudio. Este fenómeno podría deberse al reportado por otros autores que señalan que pacientes de esta edad presentan un ritmo de asistencia asidua y continua a los centros de salud, debido a los programas de vacunación y control implantados en esta etapa de la vida, por lo que probablemente tienen mayores posibilidades de acceso al diagnóstico, así como al análisis microbiológico enfocado al aislamiento del patógeno (10,58).

Analizando el tipo de cuadro clínico producido con respecto a la edad de los pacientes, se observó que todas las franjas etarias presentaron frecuencias mayores de aislamientos causantes de infecciones de piel y partes blandas, entre 77,5% a 86,7% con respecto al total de

aislamientos por franja. Esto podría deberse a dos fenómenos: el criterio de toma de muestra implementado en este estudio estaba enfocado a captar aislados comunitarios, los que en la mayoría de los casos presentan cuadros clínicos más leves de la infección, motivo por el que no requieren de internación; y otro punto importante al cual podía atribuirse este hecho podrían ser las características de las etapas de la vida que abarcó el muestreo: lactancia, niñez y adolescencia, en las cuales se presentan con mayor frecuencia situaciones como golpes, caídas, raspones de piel, que dañan la epidermis la cual queda expuesta a los microorganismos que ingresan y causan infecciones, motivo por el que los niños son más susceptibles de desarrollar este tipo de infecciones causadas por *S. aureus*. Algunos autores indican que el *S. aureus* asociado a la comunidad, causa preferentemente infecciones de piel y partes blandas y raramente enfermedades graves como neumonía necrotizante y otros, de forma coincidente con lo que hemos observado. Naimi y colaboradores en el 2003 indicaron que los aislamientos de *S. aureus* asociados a la comunidad infectan generalmente a los más jóvenes de la población y se relacionan casi siempre con infecciones de piel y partes blandas. Otros autores mencionan que de las aproximadamente 100.000 infecciones anuales causadas por SARM en EEUU en el 2011, 1.000 ocurren en niños menores a 1 año de edad, lo cual equivaldría al 1% del total, por las características que presenta esta población, algunas ya mencionadas anteriormente y a las que se suma la colonización materna por *S. aureus* durante el embarazo, lo cual aumentaría las probabilidades de que el niño sea colonizado por este microorganismo al nacer(58–63).

En el caso de infecciones invasivas se registró la mayor frecuencia en aislados provenientes de muestras de niños de 0 a 60 meses de edad (22,5%), respecto a las demás franjas etarias con 13,3% y 14,9%. El escaso e insuficiente desarrollo del sistema inmunológico a esta edad puede ser un factor importante en la ocurrencia de cuadros infecciosos más graves, ya que esta bacteria normalmente forma parte de la flora microbiana de la piel, y sólo causa infecciones ante

determinadas situaciones como una rotura o lesión de la barrera natural de la piel o en situaciones de inmunodepresión, pudiendo incluso dar lugar a infecciones sistémicas(58).

La mitad de los casos se registraron durante los meses de verano, de diciembre a marzo de 2010, de los cuales el 82,9% correspondían a cuadros infecciosos provenientes de piel y partes blandas. Las condiciones climáticas en esta época, caracterizadas por calor y humedad, son propicias para acrecentar el riesgo de infecciones de piel por *S. aureus*, debido a que la piel está más expuesta a la intemperie y a las picaduras de insectos, que facilitan el ingreso del microorganismo a la piel; hallazgos similares a éstos han sido reportados en un estudio realizado en Argentina en el año 2009 en el que Paganini reporta, que de los 281 aislados SARM comunitarios colectados de niños de diversos centros hospitalarios del país, el 45,2% (n=127) fueron colectados entre los meses de verano. Si bien en los meses de invierno disminuyó el número de aislados colectados, se mantuvo la tendencia de mayor frecuencia de aquellos aislados causantes de infecciones de piel y partes blandas, ya que incluso en esta época las temperaturas en nuestro país presentan una media de 22,8 °C (con una mínima 17,6 °C y máxima de 30,0 °C), por ser de clima subtropical, según fuentes oficiales de meteorología (10,64,65).

Los pacientes a los cuáles está enfocado este estudio, los de la comunidad, generalmente presentan cuadros más leves de la infección y no llegan a desarrollar, al momento de la toma de muestra, infecciones invasivas, severas o sistémicas, que requieran de internación, coincidente con lo reportado por otros autores(60). Kaplan y colaboradores en el año 2005 también indicaron que los aislados de *S. aureus* asociados a la comunidad, sean resistentes o no a meticilina, se caracterizan por causar en la mayoría de los casos infecciones de piel y partes blandas(66).

Nos llamó la atención el hecho de que el número de aislados colectados en diciembre de 2009 fue 2,7 veces más que los registrados en diciembre de 2010. Es poco probable que este fenómeno responda a diferencias de temperatura media entre ambos años de estudio, ya que

según fuentes oficiales este parámetro registró apenas una variación de 0,1°C entre ambos meses(65). Sin embargo no podemos descartar una distribución que varíe en el tiempo en base a otros factores epidemiológicos como la circulación de clones con virulencia variable o incluso una menor frecuencia de concurrencia a centros de atención médica por presentación de infecciones benignas y autolimitadas.

5.2. Aislados de *S. aureus*

5.2.1. Susceptibilidad a antibióticos

Los niveles de resistencia a meticilina registrados en este trabajo son menores (22,1%) que aquellos datos nacionales (32%) publicados por la Red de Vigilancia de Resistencia a Antimicrobianos del Laboratorio Central de Salud Pública del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social en julio del 2013 (51). Sin embargo es importante señalar que los datos de esta red incluyen de forma indistinta aislados provenientes tanto de niños como de adultos de todos los puntos del país, mientras que nuestro estudio solo incluyó a niños del departamento central, a lo que pueden deberse los diferentes niveles de resistencia a meticilina registrados. Nuestros resultados son similares a trabajos realizados a nivel regional que reportan niveles de entre el 11% al 48% de SARM comunitarios. Así por ejemplo Paganini y colaboradores en el 2009 encontraron niveles de resistencia a meticilina del 48,28% a partir 840 aislados de *S. aureus* colectados de niños argentinos, Cortes en el 2007 reportó que 26,8% eran aislados SARM comunitarios entre 2308 aislados de *S. aureus* estudiados, Sola en el 2006 con 37% de aislados SARM comunitarios en Córdoba, y Tamariz en el 2010 con 11,1% de SARM comunitarios en Lima de un total de 276 aislados colectados en un estudio multicéntrico (10,51,62,67,68).

El hecho de no registrar aislados resistentes a vancomicina, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina y teicoplanina, pone de manifiesto el potencial aún intacto de estos antibióticos para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* de comunidad. Estos resultados

coinciden con los reportados en otras publicaciones (59,69,70), que indican que los niveles de resistencia en aislados de *S. aureus* asociados a la comunidad son muy bajos y que en el caso de aislados SARM, en una gran proporción, sólo presentan niveles de resistencia a meticilina y a todos los betalactámicos, por no portar plásmidos y trasposones que codifican resistencia a múltiples antibióticos, los cuáles son característicos de aislados de ambientes hospitalarios. Sin embargo con la aparición en el continente de cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina aumenta la necesidad de mantener sistemas de vigilancia eficientes que puedan dar alarmas a tiempo real (71,72).

El 100% de los aislados SARM y 97% de los SASM fueron resistentes a penicilina, de forma coincidente con estudios que reportan niveles de resistencia a la penicilina en aislados comunitarios mayores al 90% en América Latina, sean sensibles o no a la meticilina (4,29,73). Los niveles de resistencia a cloranfenicol son similares tanto en aislados SASM (34,4%) como en los SARM (36,4%). En cuanto a la resistencia a eritromicina y clindamicina se observaron porcentajes mayores de resistencia entre los aislados meticilino resistentes que entre los meticilino sensibles. Se obtuvo 20,0% y 12,0% de resistencia para eritromicina y clindamicina respectivamente en los SARM, resultados similares encontraron otros autores que reportaron porcentajes de resistencia entre 12 a 31,7% a eritromicina y entre 9 a 20,1% para el caso de la clindamicina, en aislados SARM asociados a la comunidad. Probablemente el uso preferente de clindamicina para el tratamiento de infecciones producidas por SARM resistente a eritromicina favorezca la aparición de resistencia al mismo durante el tratamiento, así como el uso de esquemas de tratamientos empíricos no siempre ajustados a resultados microbiológicos específicos del paciente (10,62,70,74–76).

El análisis de la frecuencia de susceptibilidad a antibióticos entre SARM y SASM mostró mayor frecuencia de resistencia a gentamicina en SARM, siendo esta diferencia estadísticamente

significativa. Estos resultados fueron mayores a los registrados a nivel regional, como el 7% de SARM resistentes a gentamicina reportados en niños argentinos por Paganini y colaboradores en el 2009, o el 2% de resistencia a gentamicina observada por Reyes y colaboradores en el 2009 en aislados SARM comunitarios de un estudio multicéntrico en el que se incluyeron 1570 aislados de varios países: Perú, Colombia, Ecuador y Venezuela (10,77).

Una posible causa de este elevado porcentaje de resistencia a gentamicina observado en los aislados SARM comunitarios estudiados podría deberse a la adquisición de secuencias que median la resistencia a éste antibiótico en las cepas SARM (78). Aún así, los niveles de resistencia a gentamicina registrados en este estudio son similares a los reportados en otros países como España que en el año 2004, mostró que el nivel de resistencia a gentamicina fue de 16,9% en aislados con las mismas características (10,74).

5.3. Factores de Virulencia

La importancia de la detección de genes codificantes de los diversos factores de virulencia que pueden ser portados por el *S. aureus* se debe al interés de caracterizar los aislados y determinar aquellos que de forma individual o asociados a otros podrían estar involucrados en cuadros más graves de la infección (9,11,60,79–81).

5.3.1. Estandarización de la técnica

Se comprobó que el método de extracción simplificado y rápido de ADN, descrito por Zhang y colaboradores 2004 fue efectivo para la detección de los genes codificantes de los factores de virulencia: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seh*, *hla*, *hly*, *eta* y *etb* de *S. aureus*.

5.3.1.1. Obtención de controles positivos

El hecho de no contar con controles positivos para la detección de los genes codificantes de factores de virulencia no fue un impedimento para continuar con el estudio; ya que el acceso a un biobanco de centenares de muestras de ADN de *S. aureus* permitió identificar aislados

portadores de los genes de interés que pudieron emplearse como controles positivos en las reacciones de amplificación. Los porcentajes de identidad obtenidos de las secuencias de ADN de los genes codificantes de factores de virulencia y las de la base de datos del NCBI (mayor o igual a 95%), fueron lo suficientemente altos como para ser confiables y útiles en la utilización como controles positivos de las reacciones de amplificación. Es importante destacar que esta misma estrategia podría emplearse en el futuro para la estandarización de técnicas moleculares orientadas a buscar otros factores de virulencia. Así mismo el trabajo realizado permitió determinar el perfil de virulencia de las muestras componentes del biobanco.

5.3.1.2. Frecuencia de factores de virulencia

En este estudio se analizó la presencia de 10 genes codificantes de factores de virulencia en 113 aislados de *S. aureus*, en los cuáles se encontraron frecuencias de entre 0 a 37% de los mismos. Estudios similares a éste se han realizado en otros países, como el de Sauer y colaboradores, que en el 2008 publicaron un artículo en el que analizaron la presencia de 13 genes codificantes de factores de virulencia (*tst*, *pvl*, *eta*, *etb*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* y *sej*) en 100 aislados de SARM colectados de todo tipo de muestras infecciosas de pacientes adultos y encontraron frecuencias de entre 0 al 77% de genes codificantes de factores de virulencia (9). Collery en el mismo año analizó 48 aislados colectados de hisopados nasales de niños sanos sometidos a screening de 16 genes codificantes de factores de virulencia (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selq*, *tst*), la frecuencia de los factores de virulencia encontrada en estos aislados fue del 0 al 90% (11). Las frecuencias encontradas en nuestro estudio se encuentran dentro del rango esperado por los estudios mencionados anteriormente. En Paraguay existían estudios puntuales de la portación de *S. aureus* productor de enterotoxinas C y D (Weiler y colaboradores, 2009) y registros de PVL (Carpinelli y colaboradores, 2011 y Guillén y colaboradores, 2011). Este es el primer reporte de frecuencia de ciertos genes codificantes de

factores de virulencia en aislados de *S. aureus* colectados de muestras humanas, por lo que no existían precedentes con los que comparar nuestros datos (47,49,50).

5.3.1.2.1. Leucocidina de Pantón Valentine

Numerosos reportes alrededor del mundo indican que la frecuencia general de portación del gen codificante para la PVL oscila entre el 37 al 78% en aislados de *S. aureus* provenientes de muestras de niños (16,82–86). En este estudio se registró una frecuencia global de portación de la PVL (37,2%) en aislados de *S. aureus* comunitarios comparable a los datos citados.

Si bien la leucocidina de Pantón Valentine generalmente se encuentra presente en aislados de *S. aureus* comunitarios resistentes a la meticilina, que presentan *cassette SCCmec IV* (59,87), la misma puede estar presente en aislados SASM o SARM que posean otro tipo de *cassette SCCmec*. En este trabajo encontramos que la portación es mayor en aislados SARM (42,3%) que en SASM (35,2%), pero menor que lo observado en otros reportes a nivel mundial, que indican niveles de portación de PVL en aislados SARM de entre 83 al 100% provenientes de muestras de niños de la comunidad y del 9 al 46% en aislados SASM con las mismas características (16,82–85,88).

Al analizar la presencia del gen codificante de PVL en aislados que produjeron cuadros invasivos observamos menos cuadros graves producidos por aislados SARM portadores del gen codificante de la PVL que por los que no lo portaban. El rol de la PVL en el desarrollo de cuadros infecciosos más severos está aún en conflicto, ya que existen estudios experimentales que refuerzan esta teoría y otros que indican que la expresión del gen *luk-PV* interfiere en una red regulatoria del sistema inmunológico encargada de potenciar la virulencia de la infección (16,17,89,90). A este conflicto, debemos sumar el hecho que en este estudio nos hemos limitado a la detección del gen y no al estudio de la expresión en sí de la proteína, así como tampoco se han estudiado factores propios del niño infectado que puedan tener influencia en el desarrollo de

cuadros graves.

5.3.1.2.2. Enterotoxinas A, B, C, D y H

Los porcentajes generales de enterotoxinas hallados en este estudio fueron bajos en comparación con otros (**Tabla 17**). Alrededor del mundo se realizaron numerosos trabajos en los cuáles indican la frecuencia y distribución de los genes codificantes de enterotoxinas, la mayoría de estos mencionan niveles de portación que oscilan entre el 0 al 8,3% para las enterotoxinas B, C, D y H. Para el caso de la enterotoxina A las publicaciones internacionales reportan niveles entre 12 y 35,4%, mayores a lo reportado en este estudio. Esto es probablemente debido a los criterios de selección de muestras empleado, que provenían principalmente de cuadros clínicos compatibles con infecciones de piel y partes blandas, y no de aquellas provenientes de cuadros gastrointestinales, en las que habría mayor posibilidad de aislamiento de cepas portadoras de enterotoxinas. Sin embargo algunos autores indican que la prevalencia de enterotoxinas debe controlarse en aislados de *S. aureus* de todo tipo, sean éstos de cuadros infecciosos diversos u obtenidos de hisopados nasales de personas sanas, portadoras del microorganismo, debido al potencial riesgo de brotes, por contaminación de alimentos, transmisión horizontal y todos aquellos productos de manufactura que sean manipulados por el portador, lo cual representa un riesgo para la salud pública (25,80).

Independientemente de los datos de frecuencia de enterotoxinas, estos aislados causan graves brotes. De hecho en nuestro país, en el año 2007 ocurrió un incidente de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada contaminada con *S. aureus* portador de enterotoxinas C y D. En dicha ocasión se registraron 400 casos, de los cuales 60 requirieron hospitalización e incluso se registró el óbito de un menor lactante. Los aislamientos de 3 pacientes, de un operario y de las muestras de leche portaron los genes que codifican las enterotoxinas C (*sec*) y D (*sed*), y presentaron un patrón único de macrorrestricción (*SmaI*-

PFGE). Se identificó a la leche como fuente de intoxicación y a un operario de la línea de producción como origen de la contaminación. Este fue el primer brote de enfermedad transmitida por alimentos causado por *S. aureus* productor de toxinas denunciado en Paraguay, en el que se pudo aislar, caracterizar y subtipificar el agente etiológico en todas las fuentes de contaminación y afectados. La caracterización molecular de estas cepas de *S. aureus* requirió la colaboración del Instituto Malbrán de Argentina (47).

Esta situación pone de manifiesto la necesidad a nivel nacional de la implementación de metodología molecular que permita el análisis rápido en casos de sospechas de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con *S. aureus*. Siendo esto último uno de los aportes relevantes del presente trabajo de tesis y cuyas aplicaciones a futuro incluyen un sin número de situaciones asociadas a temas relevantes en salud pública.

5.1.1.1.1. Hemolisinas alfa y beta

Existen pocas publicaciones a nivel mundial que reportan frecuencias de hemolisina alfa en aislados de *S. aureus* de muestras clínicas humanas, ya que la misma es activa en la mayoría de las células de mamíferos, pero principalmente en células de conejos. Un alto porcentaje de cepas de *S. aureus* portan el gen codificante de la hemolisina alfa, algunos estudios reportan hasta 100% de portación del gen *hla* en aislados de *S. aureus* (**Tabla 17**) (91,92).

La función de las hemolisinas beta durante la enfermedad aún no se dilucidó muy bien, pero se sabe que son altamente hemolíticas para eritrocitos de ovejas antes que de conejos, como las hemolisinas alfa, debido a la diferencia de afinidad por esfingomielina que presentan (7). A nivel mundial también se reportan altos niveles de genes codificantes para hemolisinas beta (92,6%) (91), y por consiguiente de fenotipo beta hemolítico, por lo que el aislado del microorganismo es preferible realizar en agar sangre de carnero, en el que se observa mejor este efecto. En nuestro estudio sólo encontramos 8,8% de portación del gen *hlb*.

Tabla 17. Incidencia de los genes que codifican factores de virulencia de este estudio, comparadas con datos de la literatura.

Gen	Frecuencia en este estudio (%)	Frecuencia en otros estudios (%)	Especificación tipo de muestra	Referencia
<i>luk-pv</i>	37,2	56,0	59 <i>Sau</i> -CO ¹ de IPPB ² de niños	Martínez-Aguilar et al, 2004
		37,0	19 <i>Sau</i> -CO de IPPB de niños	Sdougkos et al, 2007
		66,0	89 <i>Sau</i> -CO de IPPB de niños	Bocchini et al, 2006
		78,0	103 <i>Sau</i> -CO cuadros invasivos de niños	Gonzalez et al, 2005
<i>sea</i>	2,7	35,4	99 SARM-CO ³ de IPPB y cuadros invasivos de niños	Wu et al, 2011
		12,0	100 SARM-HA ⁴ IPPB, cuadros invasivos y portación adultos	Sauer et al, 2008
<i>seb</i>	0,9	3,0	100 SARM-HA IPPB, cuadros invasivos y portación adultos	Sauer et al, 2008
		0,0	70 <i>Sau</i> -HA ⁵ de cuadros invasivos y portación adultos	Peck et al 2009
<i>sec</i>	0,0	2,0	100 SARM-HA IPPB, cuadros invasivos y portación adultos	Sauer et al, 2008
		8,3	48 <i>Sau</i> -CO portación estudiantes de salud	Collery et al, 2008
<i>sed</i>	0,0	0,0	48 <i>Sau</i> -CO portación estudiantes de salud	Collery et al, 2008
		0,0	99 SARM-CO de IPPB y cuadros invasivos de niños	Wu et al, 2011
<i>seh</i>	0,9	0,0	100 SARM-HA IPPB, cuadros invasivos y portación adultos	Sauer et al, 2008
		8,3	48 <i>Sau</i> -CO portación estudiantes de salud	Collery et al, 2008
<i>hla</i>	31,8	100,0	81 <i>Sau</i> -HA de IPPB y cuadros invasivos	Argudín et al, 2009
<i>hlb</i>	8,8	92,6	81 <i>Sau</i> -HA de IPPB y cuadros invasivos	Argudín et al, 2009
<i>eta</i>	2,7	2,0	108 <i>Sau</i> -CO de IPPB y cuadros invasivos	Xie et al, 2011
		1,0	99 SARM-CO de IPPB y cuadros invasivos de niños	Wu et al, 2011
<i>etb</i>	1,8	3,0	155 <i>Sau</i> de infecciones invasivas y 179 <i>Sau</i> de portadores	Peacock et al, 2002
		0,0	108 <i>Sau</i> -CO de IPPB y cuadros invasivos	Xie et al, 2011

¹*Sau*-CO: *S. aureus* aislado de la comunidad

²IPPB: Infecciones de piel y partes blandas

³SARM-CO: *S. aureus* resistente a meticilina aislado de la comunidad

⁴SARM-HA: *S. aureus* resistente a meticilina aislado del hospital

⁵*Sau*-HA: *S. aureus* aislado del hospital

5.1.1.1.2. Toxinas exfoliativas A y B

Los niveles reportados de toxinas exfoliativas A y B en este estudio son bajos, lo cual era de

esperarse, ya que los aislados estudiados no ocasionaron el síndrome de la piel escaldada (SSSS), cuadro clínico asociado a la presencia de las toxinas exfoliativas, pero estos niveles se encuentran dentro del rango reportado por diversos autores a nivel mundial (**Tabla 17**) (60,79,93). A pesar del bajo porcentaje registrado, el 33% de los aislados portadores de la toxina exfoliativa A y el 50% de los aislados portadores de la toxina exfoliativa B produjo infecciones invasivas.

5.1.1.2. Combinaciones de factores de virulencia

El perfil de virulencia más frecuente encontrado en nuestro estudio fue la portación individual del gen codificante de la PVL, y el mayor porcentaje de éstos fueron SARM y produjeron infecciones de piel y partes blandas, coincidiendo con publicaciones que indican que éste es un factor de virulencia presente en aislados comunitarios que causan preferentemente infecciones de piel y partes blandas que no requieren hospitalización (16,17,94), pero esto está aún en discusión y se siguen realizando estudios que refuercen esta teoría y demuestren que la PVL sólo en combinación con otros factores de virulencia produce infecciones severas e invasivas (16). Por lo mencionado anteriormente, es importante resaltar que en este estudio, el 62% (n=5) de los aislados SARM responsables de causar infecciones invasivas fueron portadores de por lo menos un factor de virulencia, llegando incluso a registrarse aislados que presentaron portación simultánea de genes codificantes para la PVL, hemolisina A y B. Lo que nos induce a pensar que la presencia de estos factores de virulencia sumado al aún escaso desarrollo del sistema inmunológico en los niños, podría contribuir al desarrollo de cuadros más graves de la infección en aislados comunitarios.

Si bien, se observa mayor porcentaje de PVL en aislados provenientes de infecciones de piel y partes blandas y en los provenientes de cuadros invasivos se observa mayor frecuencia de hemolisinas, toxinas exfoliativas y enterotoxinas, estas diferencias observadas a simple vista no

son estadísticamente significativas. Es importante tener en cuenta que esto podría deberse al bajo número de aislados provenientes de muestras clínicas de cuadros graves, con respecto a la cantidad de aislados provenientes de muestras clínicas de piel y partes blandas analizados.

5.2. Tipificación por MLVA

5.2.1. Estandarización de la técnica

Algunas de las condiciones de reacción citadas en el artículo original de Sabat y colaboradores tuvieron que ser modificadas, por no observarse amplificación o producirse de forma parcial. Se comprobó que el método de extracción simplificado y rápido de ADN por ebullición, descrito por Zhang y colaboradores en el 2004, generaba amplificaciones parciales para el análisis de la variabilidad genética de *S. aureus*, por lo que se procedió a realizar la extracción y purificación del ADN con kits comerciales; incluso a pesar de que autores como Rivero-Pérez y col. en el 2010 realizaron una evaluación de la metodología MLVA en la cual indicaron que esta PCR puede ser realizada exitosamente directamente de la suspensión celular, sin extracción previa del mismo. Los sistemas de amplificación múltiple se caracterizan por complejas interacciones tanto entre el molde y los diferentes oligonucleótidos presentes en la mezcla de reacción, pudiendo generar productos inespecíficos o bien inhibir la amplificación de ciertos locus. La presencia de impurezas en el ADN empleado como molde podría favorecer este último fenómeno (39,40,54). Otro factor que se ha descrito como causante de inhibición en las reacciones de PCR múltiples es la cantidad de ADN molde empleado, tanto el exceso o el déficit del mismo. El uso de cantidades previamente cuantificadas de ADN como molde mostró los mejores resultados con 40 ng por reacción. En afán de mejorar el rendimiento y la eficiencia de la reacción se disminuyó la concentración del buffer, temperatura de anillamiento y se incluyó DMSO en la mezcla de reacción, todos estos factores contribuyeron de algún modo para obtener las condiciones óptimas de reacción.

Teniendo en cuenta la amplificación repetida de una cepa de referencia como la ATCC29213, se observó la amplificación de la totalidad de los locus en los 7 experimentos realizados. Así mismo el tamaño de los productos obtenidos para cada locus generó valores con mínimas variaciones de tamaño, menores del 5% para fragmentos mayores y de hasta el 18% para fragmentos menores. Estas variaciones son propias de la técnica de electroforesis y no afectaron la posición de dicha cepa dentro de los dendogramas. Esto denota un alto nivel de reproducibilidad de la reacción MLVA, coincidiendo con lo descrito por otros autores quienes también indican mismo nivel de reproducibilidad, estos resultados validan el proceso (36,38,43). El empleo de cepas previamente tipificadas por MLST, tipificación PFGE, *locus spa* y *cassette SCCmec*, permitió analizar de forma comparativa el agrupamiento generado por la metodología MLVA. La MLVA organizó los 11 aislados en 8 agrupaciones, seis de ellas abarcaron un solo aislado, las otras dos agrupaciones 3 y 2 aislados respectivamente.

Aquellas agrupaciones MLVA que abarcaron un solo aislado, con resultados congruentes con otras metodologías, ya que presentaron diferentes tipos de *cassette SCCmec*, *spa type* secuenciotipo (ST) y tipo PFGE. De esta manera se comprobó que la MLVA tiene la capacidad de diferenciar aislados genéticamente diferentes, siendo esta comparable a la de otras metodologías que han sido validadas y aprobadas internacionalmente.

En cuanto a los resultados de agrupaciones de 2 o más aislados se observaron dos situaciones; la primera: en el caso de los aislados LSAU 5 y LSAU 7 que fueron clasificados como idénticos por MLVA con resultados congruentes con la totalidad de las otras técnicas moleculares comparadas y la segunda: en el caso de los aislados LSAU 23, 28 y 29 en los que la agrupación MLVA fue congruente con MLST, *spa typing* y tipo de *cassette SCCmec*, pero se observaron diferencias en el perfil PFGE.

Los resultados del primer caso demuestran que la MLVA tiene la capacidad de identificar aislados idénticos y agruparlos de forma comparable con MLST, *spa typing* y tipo de *cassette SCCmec*. Algunos estudios, como el publicado por Schouls y colaboradores en el 2009, que comparan estas metodologías, con un número mayor de aislados en estudio (n=1681), indican incluso que la MLVA incluso tiene mayor poder discriminatorio que la tipificación del locus *spA* y MLST y tiene incluso mayor rendimiento y es más fácil de llevarse a cabo que éste último (35).

Sin embargo es importante reconocer que debido a que la MLVA analiza de forma puntual la variación en 7 regiones genéticas, puede darse la situación en las que éstas sean idénticas, pero la diferencia entre aislados se encuentre en otras regiones del genoma. Por tanto la MLVA agruparía a estos aislados como idénticos, cuando sólo son similares pero diferentes y para demostrar esta diferencia se requiere el uso de PFGE. Esta situación es la que se observó en los aislados LSAU 23, 28 y 29. Aún así la capacidad discriminatoria de la MLVA no es despreciable e incluso es congruente con el uso combinado de MLST, *spa typing* y tipo de *cassette SCCmec*.

Estos resultados nos permiten sostener que la MLVA podría emplearse como un método de screening rápido y fácil de realizar y en el cuál sólo deberían someterse a técnicas de análisis del genoma completo como PFGE aquellos aislados que resulten agrupados como idénticos por MLVA. Con este tipo de estrategias no sólo se obtendrían resultados en menor tiempo y a menor costo, sino que se podría optimizar el uso de recursos en el empleo de PFGE que hasta ahora es muy restringido en Paraguay.

5.2.2. Análisis MLVA de los aislados en estudio

La tipificación MLVA se logró en el 99% de los aislados en estudio, un nivel excelente comparado con otros estudios, que reportan niveles de tipificación de entre 76 al 100%, por no

lograr la amplificación de la totalidad de los locus originando perfiles parciales, probablemente por mutaciones en las regiones de anillamiento de los oligonucleótidos (30,35,36,39).

Se observó gran variabilidad genética según la metodología MLVA en los aislados analizados en este estudio, ya que se detectaron 105 perfiles MLVA diferentes a partir de los 112 aislados analizados. Una situación similar es descrita por Holmes y colaboradores en cuya publicación también observan gran variabilidad al describir 511 perfiles MLVA diferentes obtenidos a partir de 1681 aislados de *S. aureus* (mayoría SARM 78,1%) provenientes de muestras clínicas de hisopados nasales, infecciones de piel y partes blandas, sepsis y osteomielitis de humanos, provenientes tanto de nosocomios y de la comunidad (30).

En este estudio sólo se observaron cinco agrupaciones: **4**, **11**, **39**, **54** y **90**, que abarcaron más de un aislado por poseer mismo perfil MLVA. Todas las agrupaciones observadas eran pequeñas, incluyendo entre dos y cuatro aislados cada una, por lo que atenúa la posibilidad de un brote en los aislados estudiados.

En las agrupaciones **11** y **54** todos los aislados agrupados tenían el mismo perfil de virulencia, mismo antibiotipo, fueron aislados en un corto lapso de tiempo (<29 días), en el mismo nosocomio y fueron causantes de infecciones de piel y partes blandas.

La agrupación **39** a su vez, agrupó aislados que fueron colectados de nosocomios diferentes en un periodo de tiempo de 11 días, ambos fueron causantes de infecciones de piel y partes blandas, y presentaron mismo genotipo y antibiotipo.

En el caso de la agrupación **90**, los dos aislados fueron colectados en el mismo nosocomio y mismo día, presentaron igual fenotipo y genotipo, pero uno de ellos fue causante de infección invasiva y el otro de infección de piel y partes blandas.

Las cuatro agrupaciones mencionadas anteriormente, eran pequeñas (n=2), presentaron aislados con el mismo perfil fenotípico y genotípico y características epidemiológicas muy parecidas, lo

que indica que son aislados muy similares, sin embargo para poder concluir si son idénticos deben ser sometidos a PFGE.

En la agrupación **4**, se observó la mayor cantidad de aislados (n=4), todos ellos aislados del mismo nosocomio, aislados de infecciones de piel y partes blandas, en un periodo de tiempo de 8 meses, y presentaron el mismo antibiotipo y genotipo, pero sólo dos de ellos fueron portadores del gen que codifica para la leucocidina de Pantón Valentine. Estos aislados deben ser confirmados por PFGE para corroborar que sean similares o idénticos.

Este estudio demuestra la habilidad de la MLVA para identificar aislados genéticamente diferentes y agrupar los relacionados estrechamente entre sí, que puedan tratarse del mismo clon. Sin embargo, la MLVA, al igual que otras metodologías validadas como la MLST y la tipificación del locus *spa*, al agrupar como aislados idénticos aquellos muy estrechamente relacionados, el resultado debería verificarse por la PFGE, que es la metodología *gold standard* y hasta ahora la única comprobada que posea mayor resolución, por analizar el genoma completo, lo que aumenta su poder discriminatorio.

En cuanto al análisis MLVA realizado con los aislados SARM, éste fue el tipo de aislado que concentró el mayor número de agrupamientos, ya que en 25 aislados SARM analizados, están contenidos 3 del total de 4 agrupamientos detectados en 112 aislados.

Con respecto a los aislados provenientes de cuadros clínicos invasivos, se observó gran variabilidad, con lo que se ve disminuida la posibilidad de que un clon más virulento sea el causante de las patologías más graves y por tanto sugiere la circulación de muchos clones virulentos diferentes. Esto propone la realización de un estudio molecular a futuro para identificar los clones causantes de estas infecciones.

Este estudio indica que si la MLVA se utilizara como método de screening, del total de los 112 aislados, tan sólo los 12 aislados que resultaron agrupados como idénticos precisarían PFGE

para confirmación, con lo que hay una gran reducción del tiempo y costo del análisis y una mayor eficiencia de respuesta ante situaciones breves.

Los datos obtenidos a través de la metodología MLVA en este y otros estudios muestran claramente que esta cumple todos los criterios de un método de tipificación útil, y se puede adaptar a los estudios epidemiológicos a gran escala de las infecciones estafilocócicas e incluso en análisis de brotes, en los cuáles para confirmar los aislados que estén agrupados como idénticos por esta metodología deban ser confirmados por PFGE. Frente a las metodologías validadas mencionadas anteriormente, la MLVA presenta las ventajas de tener bajo costo, ser simple y requerir poco tiempo para su ejecución, lo que hace que esté disponible para ser llevada a cabo de rutina en los laboratorios, principalmente como herramienta epidemiológica molecular para monitoreo (30,38,39).

5. Conclusión

Este trabajo permitió la identificación y validación de controles positivos y determinación de condiciones óptimas de reacciones de amplificación de ADN para la detección molecular de genes codificantes de los siguientes factores de virulencia: leucocidina de Pantón Valentine, enterotoxinas A, B, C, D y H, hemolisinas alfa y beta y toxinas exfoliativas A y B.

El gen codificante de la leucocidina de Pantón Valentine fue el más frecuente en los aislados de *S. aureus* analizados, seguido de los genes codificantes de hemolisinas alfa y beta. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en los perfiles de virulencia de aislados de *S. aureus* colectados de la comunidad según la gravedad del cuadro clínico, tampoco entre aislados resistentes o sensibles a meticilina.

Se logró la amplificación de los siete *locus* de la metodología MLVA de forma reproducible en los aislados estudiados. Fueron considerados como factores críticos para lograr eficiencia en la reacción, el grado de purificación del ADN empleado como molde y para la obtención del dendograma la optimización de la corrida electroforética.

Este estudio demuestra la habilidad de la MLVA para identificar aislados genéticamente diferentes, con un desempeño similar a otras metodologías validadas y aprobadas internacionalmente como la MLST, tipificación del locus *spA*, *cassette SCCmec* y PFGE. Sin embargo, la MLVA, al igual que las metodologías validadas como la MLST y la tipificación del locus *spA*, al agrupar como aislados idénticos aquellos muy estrechamente relacionados, el resultado debería verificarse por la PFGE, que es la metodología *gold standard* y hasta ahora la única comprobada que posea mayor resolución que la MLVA, por analizar el genoma completo, lo que aumenta su poder discriminatorio.

La MLVA cumple todos los criterios de un método de tipificación útil, como herramienta epidemiológica molecular para monitoreo y se puede adaptar a los estudios epidemiológicos a gran escala de las infecciones estafilocócicas e incluso en análisis de brotes, en los cuáles para

confirmar los aislados que estén agrupados como idénticos por esta metodología deban ser confirmados por PFGE.

6. Referencias Bibliográficas

1. Koneman EW, Allen S. Koneman. *Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana; 2008. 1699 p.
2. Berdasquera Corcho D. El control de las enfermedades infecciosas en la atención primaria de salud: un reto para la medicina comunitaria. *Rev Cuba Med Gen Integral*. 2007;23(1):0-0.
3. Gardam MA. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* an emerging community pathogen? A review of the literature. *Can J Infect Dis*. 2000;11(4):202-11.
4. Velázquez-Meza ME. [Staphylococcus aureus methicillin-resistant: emergence and dissemination]. *Salud Pública México*. 2005;47(5):381-7.
5. Mostofsky E, Lipsitch M, Regev-Yochay G. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* replacing methicillin-susceptible *S. aureus*? *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(10):2199-214.
6. Salvador C, Acevedo C, Bennani A. *Técnicas para la detección de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en el laboratorio de microbiología clínica AEFA*. 2005. ^a ed. 2005.
7. Bustos-Martínez. JA Gutiérrez-Cárdenas, M, Hamdan-Partida, A, Gutiérrez-Cárdenas, M. *Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad*. *Rev Biomed*. 2006;17:287-305.
8. Threat Report 2013 | Antimicrobial Resistance | CDC [Internet]. [citado 4 de marzo de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
9. Sauer P, Síla J, Štosová T, Večeřová R, Hejnar P, Vágnerová I, et al. Prevalence of Genes Encoding Extracellular Virulence Factors Among Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. *J Med Microbiol*. 2008;57(4):403-10.
10. Paganini M, Della L P, Muller O B, Ezcurra G, Uranga M, Aguirre C, et al. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquiridas en la comunidad en niños antes sanos y en niños relacionados al hospital en la Argentina. *Rev Chil Infectol*. 2009;26(5):406-12.
11. Collery MM, Smyth DS, Twohig JM, Shore AC, Coleman DC, Smyth CJ. Molecular Typing of Nasal Carriage Isolates of *Staphylococcus Aureus* from an Irish University Student Population Based on Toxin Gene PCR, Agr Locus Types and Multiple Locus, Variable Number Tandem Repeat Analysis. *J Med Microbiol*. 2008;57(3):348-58.
12. Blomfeldt A, Aamot HV, Eskesen AN, Müller F, Monecke S. Molecular characterization of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates from bacteremic patients in a Norwegian University Hospital. *J Clin Microbiol*. 2013;51(1):345-7.
13. Chan PF, Foster SJ. The role of environmental factors in the regulation of virulence-determinant expression in *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Microbiology*. 1998;144(9):2469-79.
14. Cooke FJ, Brown NM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Br Med Bull*. 2010;94(1):215-27.

15. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(1):16-34.
16. Ritz N, Curtis N. The role of Pantón-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(5):514-8.
17. Shallcross LJ, Williams K, Hopkins S, Aldridge RW, Johnson AM, Hayward AC. Pantón–Valentine leukocidin associated staphylococcal disease: a cross-sectional study at a London hospital, England. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(11):1644-8.
18. Genestier A-L, Michallet M-C, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, et al. *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest.* 2005;115(11):3117-27.
19. Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Yoshiyuki Kamio. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage ϕ PVL carrying Pantón–Valentine leukocidin genes. *Gene.* 1998;215(1):57-67.
20. Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbancon V, et al. Pantón-Valentine leukocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun.* 1995;63(10):4121-9.
21. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón-Valentine leukocidin. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 2007;87(1):3-9.
22. Plano LRW, Gutman DM, Woischnik M, Collins CM. Recombinant *Staphylococcus aureus* Exfoliative Toxins Are Not Bacterial Superantigens. *Infect Immun.* 2000;68(5):3048-52.
23. Kato F, Kadomoto N, Iwamoto Y, Bunai K, Komatsuzawa H, Sugai M. Regulatory Mechanism for Exfoliative Toxin Production in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2011;79(4):1660-70.
24. Shanehbandi D, Baradaran B, Sadigh-Eteghad S, Zarredar H. Occurrence of Methicillin Resistant and Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Traditional Cheeses in the North West of Iran. *ISRN Microbiol [Internet].* [citado 4 de abril de 2014];2014. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3945431/>
25. Manfredi EA, Leotta GA, Rivas M. PCR múltiple para la detección de los genes sea, seb, sec, sed y see de *Staphylococcus aureus*: Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Rev Argent Microbiol.* 2010;42(3):212-5.
26. Alouf JE, Müller-Alouf H. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol.* 2003;292(7–8):429-40.
27. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science.* 1990;248(4956):705-11.
28. Riley LW. *Molecular epidemiology of infectious diseases: principles and practices.* 2004;xii + 348 pp.

29. Rodríguez-Noriega E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, Alvarez C, Bavestrello L, et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Dis.* 2010;14(7):e560-6.
30. Holmes A, Edwards GF, Girvan EK, Hannant W, Danial J, Fitzgerald JR, et al. Comparison of Two Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Methods and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Differentiating Highly Clonal Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3600-7.
31. Mayor L, Ortellado J, Menacho C, Lird G, Courtier C, Gardon C, et al. Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Collected in Asunción, Paraguay. *J Clin Microbiol.* 2007;45(7):2298-300.
32. Chanin JM, Marcos LA, Thompson BM, Yusen RD, Dunne WM, Warren DK, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Clone as a Cause of Lemierre's Syndrome. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):2063-6.
33. Kennedy AD, Porcella SF, Martens C, Whitney AR, Braughton KR, Chen L, et al. Complete Nucleotide Sequence Analysis of Plasmids in Strains of *Staphylococcus aureus* Clone USA300 Reveals a High Level of Identity among Isolates with Closely Related Core Genome Sequences. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4504-11.
34. Vílchez G, Alonso G. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *RSVM.* 2009;(29):6-12.
35. Schouls LM, Spalburg EC, van Luit M, Huijsdens XW, Pluister GN, van Santen-Verheuve MG, et al. Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis of *Staphylococcus Aureus*: Comparison with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and *spa*-Typing. *PLoS ONE.* 2009;4(4).
36. Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, et al. Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *spa* Typing, and Multilocus Sequence Typing for Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3095-100.
37. Bustamante AV, Lucchesi PMA, Parma AE. Molecular characterization of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 isolates from Argentina by Multiple-Loci VNTR Analysis (MLVA). *Braz J Microbiol.* 2009;40(4):927-32.
38. Rivero-Pérez B, Pérez-Roth E, Méndez-Álvarez S. Evaluation of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Typing a Polyclonal Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Population in an Area Where Such Infections Are Endemic. *J Clin Microbiol.* 2010;48(8):2991-4.
39. Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, et al. New Method for Typing *Staphylococcus aureus* Strains: Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism and Genetic Relationships of Clinical Isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1801-4.

40. Pérez-Roth E, Claverie-Martín F, Villar J, Méndez-Álvarez S. Multiplex PCR for Simultaneous Identification of *Staphylococcus aureus* and Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):4037-41.
41. Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, et al. Comparison of Seven Techniques for Typing International Epidemic Strains of *Clostridium difficile*: Restriction Endonuclease Analysis, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PCR-Ribotyping, Multilocus Sequence Typing, Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis, Amplified Fragment Length Polymorphism, and Surface Layer Protein A Gene Sequence Typing. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):431-7.
42. Van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;49(1):22-7.
43. Tenover FC, Vaughn RR, McDougal LK, Fosheim GE, McGowan JE. Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Assay Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *J Clin Microbiol*. 2007;45(7):2215-9.
44. Hall BG. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual*. Sinauer Associates, Incorporated; 2011. 282 p.
45. Rodríguez Jaume, MJ. *Análisis de Cluster o Análisis de Conglomerados. Estadística Informática: casos y ejemplos con el SpSS*. 2001.
46. Feature extraction from dendrogram in R [Internet]. [citado 7 de marzo de 2014]. Recuperado a partir de: <http://stackoverflow.com/questions/19444005/feature-extraction-from-dendrogram-in-r>
47. Weiler, N, Leotta, GA, Zarate, MN, Manfredi, E, Alvarez, ME, Rivas, M. Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay. *Revista Argentina de Microbiología*. 2011;43:33-6.
48. Carpinelli, L. Caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus aureus* aislados de trabajadores de la salud de un centro hospitalario de referencia nacional [Internet]. UNA. Dirección General de Postgrado. Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica. IICS; 2011 [citado 30 de junio de 2014]. Recuperado a partir de: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=Ink&exprSearch=600322&indexSearch=ID>
49. Guillén R, Basualdo W, Campuzano de Rolón A, Macchi M, Ortellado J, Almada P, et al. *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad: Caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños que concurren a hospitales de referencia de Paraguay. *Rev Inst Med Trop*. 2011;6:49.
50. Carpinelli L. Caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus aureus* aislados de trabajadores de la salud de un centro hospitalario de referencia nacional [Maestría en Ciencias Biomédicas]. [Asunción, Paraguay]: Universidad Nacional de Asunción; 2011.

51. MSPBS » Ministerio de Salud Publica y Bienestar Social [Internet]. MSPBS. [citado 24 de marzo de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.mspbs.gov.py/v3/>
52. «Mi hija vino a dar vida» - Nacionales - ABC Color [Internet]. [citado 21 de abril de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.abc.com.py/nacionales/mi-hija-vino-a-dar-vida-a-otros-ninos-565133.html>
53. Zhang, K., Sparling, J, Chow, BL, Elsayed, S., Hussain, Z., Church, DL. New cuadriplex PCR assay for detection of methicilin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):4947-55.
54. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):4947-55.
55. Wang D, Chen H, Li H, He Q, Ding X, Deng L. Detection of *Staphylococcus aureus* Carrying the Gene for Toxic Shock Syndrome Toxin 1 by Quantum-Dot-Probe Complexes. *J Fluoresc.* 2011;21(4):1525-30.
56. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29(3):426-30.
57. Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. book p.
58. Jimenez-Truque N, Tedeschi S, Saye EJ, McKenna BD, Langdon W, Wright JP, et al. Relationship Between Maternal and Neonatal *Staphylococcus aureus* Colonization. *Pediatrics.* 2012;129(5):e1252-9.
59. Kilic A, Li H, Stratton CW, Tang Y-W. Antimicrobial Susceptibility Patterns and Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types of, as Well as Panton-Valentine Leukocidin Occurrence among, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Children and Adults in Middle Tennessee. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4436-40.
60. Wu D, Li X, Yang Y, Zheng Y, Wang C, Deng L, et al. Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. *J Med Microbiol.* 2011;60(1):35-45.
61. Coralith García Apac. *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido en la comunidad. *Acta Med Per.* 2011;28(2):159-62.
62. Cortes JA, Gómez CA, Cuervo SI, Leal AL. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Bogotá, Colombia: Public Health implications. *Rev Salud Pública.* 2007;9(3):448-54.

63. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA J Am Med Assoc.* 2003;290(22):2976-84.
64. Dirección Nacional de Aeronáutica Civil. Tablas Climatológicas del Aeropuerto Internacional Silvio Pettirossi. Centro Meteorológico Nacional. 2013.
65. Tutiempo Network, S. L. Clima en Asunción / Aeropuerto. Tutiempo Network, S.L.;
66. Kaplan SL, Hulten KG, Gonzalez BE, Hammerman WA, Lamberth L, Versalovic J, et al. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2005;40(12):1785-91.
67. Sola C, Cortes P, Saka HA, Vindel A, Bocco JL. Evolution and Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemic and Sporadic Clones in Cordoba, Argentina. *J Clin Microbiol.* 2006;44(1):192-200.
68. Tamariz J, Agapito J, Horna G, Tapia E, Vicente W, Silva M, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. *Rev Medica Hered.* 2010;21(1):4-10.
69. Mensa, J., Gatell, J., García-Sánchez, J., Letang, E., López-Suñé, E., Marco, F. Guía de Terapéutica Antimicrobiana 2013. 23° ed. ANTARES; 2013.
70. Kaibni MH, Farraj MA, Adwan K, Essawi TA. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Palestine. *J Med Microbiol.* 2009;58(5):644-7.
71. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet.* 2013;382(9888):205.
72. Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin Resistance in *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(3):430-8.
73. Cabrera Rodríguez, LE, Díaz Rigau, L, Fernández Núñez, T, Bravo Fariñas, L. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos bacterianos causantes de infecciones comunitarias. *Rev Med Gen Integr.* 2007;23(1).
74. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sanchez-Conde M, Sanchez-Somolinos M, et al. Evolution of the Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: Five Nationwide Prevalence Studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(11):4240-5.
75. Guzmán Lista, MDC, Lozada Oca, RA. Detección de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes aislados de pacientes con infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. *Rev Soc Venez Microbiol.* 2007;27(1):349-63.
76. Siberry, GK, Tekle, T, Carroll, K, Dick, J. Failure of Clindamycin Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Expressing Inducible Clindamycin Resistance In Vitro. *Clin Infect Dis.* 2003;37:1257-60.

77. Reyes J, Rincón S, Díaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, et al. Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Sequence Type 8 Lineage in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2009;49(12):1861-77.
78. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA*. 1998;279(8):593-8.
79. Xie Y, He Y, Gehring A, Hu Y, Li Q, Tu S-I, et al. Genotypes and Toxin Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from China. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e28276.
80. Peck KR, Baek JY, Song J-H, Ko KS. Comparison of Genotypes and Enterotoxin Genes Between *Staphylococcus aureus* Isolates from Blood and Nasal Colonizers in a Korean Hospital. *J Korean Med Sci*. 2009;24(4):585-91.
81. Hu D-L, Omoe K, Inoue F, Kasai T, Yasujima M, Shinagawa K, et al. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol*. 2008;57(9):1106-12.
82. Martínez-Aguilar G, Avalos-Mishaan A, Hulten K, Hammerman W, Mason EO Jr, Kaplan SL. Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(8):701-6.
83. Bocchini CE, Hulten KG, Mason EO Jr, Gonzalez BE, Hammerman WA, Kaplan SL. Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. *Pediatrics*. 2006;117(2):433-40.
84. Carrillo-Marquez MA, Hulten KG, Hammerman W, Mason EO, Kaplan SL. USA300 is the predominant genotype causing *Staphylococcus aureus* septic arthritis in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(12):1076-80.
85. Gonzalez BE, Hulten KG, Dishop MK, Lamberth LB, Hammerman WA, Mason EO Jr, et al. Pulmonary manifestations in children with invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2005;41(5):583-90.
86. Fortunov RM, Hulten KG, Hammerman WA, Mason EO, Kaplan SL. Community-Acquired *Staphylococcus aureus* Infections in Term and Near-Term Previously Healthy Neonates. *Pediatrics*. 2006;118(3):874-81.
87. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(3):441-6.
88. Sdougkos G, Chini V, Papanastasiou DA, Christodoulou G, Tagaris G, Dimitracopoulos G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin as a cause of acute osteomyelitis in children. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(6):651-4.
89. Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, et al. Is Panton-Valentine Leukocidin the Major Virulence Determinant in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease? *J Infect Dis*. 2006;194(12):1761-70.

90. Maria Labandeira-Rey FC. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*. 2007;315(5815):1130-3.
91. Argudín MA, Mendoza MC, Méndez FJ, Martín MC, Guerra B, Rodicio MR. Clonal Complexes and Diversity of Exotoxin Gene Profiles in Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Isolates from Patients in a Spanish Hospital. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7):2097-105.
92. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):16-34.
93. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, et al. Virulent Combinations of Adhesin and Toxin Genes in Natural Populations of Staphylococcus aureus. *Infect Immun*. 2002;70(9):4987-96.
94. Tong A, Tong SYC, Zhang Y, Lamlertthon S, Sharma-Kuinkel BK, Rude T, et al. Panton-Valentine leukocidin is not the primary determinant of outcome for Staphylococcus aureus skin infections: evaluation from the CANVAS studies. *PLoS One*. 2012;7(5):e37212.

7. Anexos

ANEXO A

HOSPITAL GENERAL PEDIÁTRICO

Dra. Wilma Basualdo,
Dr. Héctor Castro,
Dra. Beatriz Quiñonez[†],
Dra. Rocío Argüello,
Dra. Noemí Zárate

HOSPITAL DE CLÍNICAS

Dra. Ana Campuzano de Rolón,
Dr. Martín Agüero,
Dra. Juana Ortellado de Canese,
Dra. Patricia Almada

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD, UNA

Dra. Rosa Guillén,
B.C. Letizia Carpinelli,
Dra. Laura Franco,
Dra. Graciela Russomando

INSTITUTO DE PREVISIÓN SOCIAL

Dra. Wilma Basualdo,
Dr. Héctor Castro,
Dra. Mónica Rodríguez,
Dra. Lorena Grau,
Dra. Carmen Espínola,
Dra. Gladys Velázquez

HOSPITAL NACIONAL DE ITAUGUÁ

Dra. Gloria Samudio,
Dra. Gloria Gómez

ANEXO B

Ficha clínica-epidemiológica diseñada específicamente para el proyecto de investigación (P20) del 2010, en el que se analizaron aislados de *S. aureus* de muestras de niños colectados de 4 hospitales de referencia de Asunción y el Dpto. Central: HGP, HCL, IPS y HNI.

Hospital/Centro Médico _____

Fecha ingreso ____/____/____ Fecha de egreso ____/____/____

Datos del paciente

Nombre y apellido _____

Sexo F M Edad años meses días Peso Talla

Dpto. _____ Distrito/Ciudad _____ Localidad/Barrio _____

DATOS CLINICOS

Cuadro clínico Infección de piel y partes blandas Artritis Sepsis Otro _____

Diagnóstico _____

Tratamiento Drenaje quirúrgico Antibióticos Otros _____

Antibióticos prescritos _____

Tratamiento con antibióticos al alta No Si, ¿Cuáles? _____

EVOLUCION Mejorado Curado Fallecido Derivado

RESULTADOS DE MICROBIOLOGÍA

Referencia interna del laboratorio _____ Fecha de aislamiento: ____/____/____

Material biológico: _____

Antibiograma

	mm	R/I/S		mm	R/I/S
Vancomicina			Penicilina		
Teicoplanina			Trim-Sulfametoxazol		
Clindamicina			Gentamicina		
Eritromicina			Tigeciclina		
Cloranfenicol			Minociclina		
Tetraciclina			Novobiocina		
Rifampicina			OTROS		
oxacilina					
Cefoxitina					
Ciprofloxacina					

RESULTADOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Fecha de recepción ____/____/____ Código proyecto

PCR *mecA* _____ PCR *pvl* _____ PCR *seh* _____ PCR *arcA* _____

Otros _____

Para la realización de este proyecto se analizaron los datos de la ficha anterior y los siguientes:

RESULTADOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Fecha de recepción ___/___/___/

Código Proyecto

--	--	--

--	--	--	--

PCR *sea*___ PCR *seb*___ PCR *sec*___ PCR *sed*___ PCR *seh*___

PCR *hla*___ PCR *hlb*___ PCR *eta*___ PCR *etb*___

Perfil MLVA_____

Agrupación de perfiles MLVA_____

ANEXO C

Para el acceso a estos datos se contó con la aprobación de los investigadores del citado protocolo y se han mantenido las autorías.



ANEXO D

Se muestran los alineamientos obtenidos para cada factor de virulencia.

Enterotoxina A (gen *sea*)

		10	20	30	40	50	60	
							
AY827552	134	GAATTGCAGGGAACAGCTTTAGGCAATCTTAAACAAATCTATTATTACAATGAAAAGCT						193
SGP 70	4	GTTTTGCAGGGAACAGCTTTAGGCAATCTTAAACAAATCTATTATTACAATGAAAAGCT						63
		70	80	90	100	110	120	
							
AY827552	194	AAAAC T GAAAATAAAGAGAGTCACGATCAATTTTTACAGCATACTATATTGTTTTAAAGGC						253
SGP 70	64	AAAAC T GAAAATAAAGAGAGTCACGATCAATTTTTACAGCATACTATATTGTTTTAAAGGC						123
		130	140	150	160	170	180	
							
AY827552	254	TTTTTTACAGATCATTCGTTGGTATAACGATTTATTAGTAGATTTTGATTCAAAGGATATT						313
SGP 70	124	TTTTTTACAGATCATTCGTTGGTATAACGATTTATTAGTAGATTTTGATTCAAAGGATATT						183
		190	200	210	220	230	240	
							
AY827552	314	GTTGATAAATATAAAGGGAAAAAAGTAGACTTGTATGGTGCTTATTATGGTTATCAATGT						373
SGP 70	184	GTTGATAAATATAAAGGGAAAAAAGTAGACTTGTATGGTGCTTATTATGGTTATCAATGT						243
		250	260	270	280	290	300	
							
AY827552	374	GCGGGTGGTACACCAACAAAACAGCTTGTATGTATGGTGGTGTAAACGTTACATGATAAT						433
SGP 70	244	GCGGGTGGTACACCAACAAAACAGCTTGCATGTATGGTGGTGTAAACGTTACATGATAAT						303
		310	320	330	340	350	360	
							
AY827552	434	AATCGATTGACCGAAGAGAAAAAAGTGCCGATCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAAAAT						493
SGP 70	304	AATCGATTGACCGAAGAGAAAAAAGTGCCAATCAATTTATGGCTAGACGGTAAACAAAAT						363
		370	380	390	400	410	420	
							
AY827552	494	ACAGTACCTTTGGAAACGGTTAAAACGAATAAGAAAAATGTAAC T GTTCAGGAGTTGGAT						553
SGP 70	364	ACAGTACCTTTGGAAACGGTTAAAACGAATAAGAAAAATGTAAC T GTTCAGGAGTTGGAT						423
		430	440	450	460	470	480	
							
AY827552	554	CTTCAAGCAAGACGTTATT TACAGGAAAAATATAATTTATATAACTCTGATGTTTTTTGAT						612
SGP 70	424	CTTCAAGCAAGACGTTATT TACAGGAAAAATATAATTTATATAACTCTGATGTTTTTTGAT						483
		490	500	510	520			
							
AY827552	613	GGG-AAAGTTTCAGAGGGG-ATTAATCGTGTTCATAC T TCT				641		
SGP 70	484	GGGGAAGTTTCAGAGGGGGATTAATCGTGTTC T TTTTAA				513		

Enterotoxina B (gen *seb*)

		10	20	30	40	50	60		
AB860415	11341							
SGP 71	1	TATTCG TACTGATATTAGTTATTTCTACACCCAACGTTT TAGCAGAGAGTCAACCAGATC						11400	
		TTTTCG CACTGATATTAGTTATTTCTACACCCAACGTTT TAGCAGAGAGTCAACCAGATC						60	
		70	80	90	100	110	120		
AB860415	11401							
SGP 71	61	CTAAACC GATGAGTTGCACAAAGCGAGTAAATTC ACTGGTTGATGGAAAATATGAAAG						11460	
		CTAAACC GATGAGTTGCACAAAGCGAGTAAATTC ACTGGTTGATGGAAAATATGAAAG						120	
		130	140	150	160	170	180		
AB860415	11461							
SGP 71	121	TTTTGT ATGATGATAATCATGTATCAGCAATAAACGTTAAATCTATAGATCAATTTCTAT						11520	
		TTTTGT ATGATGATAATCATGTATCAGCAATAAACGTTAAATCTATAGATCAATTTCTAT						180	
		190	200	210	220	230	240		
AB860415	11521							
SGP 71	181	ACTTTG ACTTAATATATCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGAAT TATGATAATGTTTCGAG						11580	
		ACTTTG ACTTAATATATCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGAAT TATGATAATGTTTCGAG						240	
		250	260	270	280	290	300		
AB860415	11581							
SGP 71	241	TCGAAT TTAAAAACAAAGATTTAGCTGATAAATACAAAGATAAA TACGTAGATGTCTTTG						11640	
		TCGAAT TTAAAAACAAAGATTTAGCTGATAAATACAAAGATAAA TACGTAGATGTCTTTG						300	
		310	320	330	340	350	360		
AB860415	11641							
SGP 71	301	GAGCTA ATTATTACTATCAATGTTATTTTCTAAAAAAACGAATGATATTAATTCACATC						11700	
		GAGCTA ATTATTACTATCAATGTTATTTTCTAAAAAAACGAATGATATTAATTCACATC						360	
		370	380	390	400	410	420		
AB860415	11701							
SGP 71	361	AAACTG ACAAACGAAAAACTTGTATGTATGGTGGTGA ACTGAGCATAATGGAAACCAAT						11760	
		AAACTG ACAAACGAAAAACTTGTATGTATGGTGGTGA ACTGAGCATAATGGAAACCAAT						420	
		430	440	450	460	470	480		
AB860415	11761							
SGP 71	421	TAGATA AAATATAGAAGTATTACTGTT CGGGTATTTGAAGATGGTAAAAATTTATTATCTT						11820	
		TAGATA AAATATAGAAGTATTACTGTT CGGGTATTTGAAGATGGTAAAAATTTATTATCTT						480	
		490	500	510	520	530	540		
AB860415	11821							
SGP 71	481	TTGACG TACAAACTAATAAGAAAAAGT GACTGC TC AAGAATTAGATTACCTA ACTCGTC						11880	
		TTGACG TACAAACTAATAAGAAAAAGT GACTGC TC AAGAATTAGATTACCTA ACTCGTC						540	
		550	560	570	580	590	600		
AB860415	11881							
SGP 71	541	ACTATT TGGTGAAAAATAAAAACTCTATGAATTT AACA ACTCGCCTTATGAAACGGGAT						11940	
		ACTATT TGGTGAAAAATAAAAACTCTATGAATTT AACA ACTCGCCTTATGAAACGGGAT						600	
		610	620	630	640	650	660		
AB860415	11941							
SGP 71	601	ATATTA AATTTATAGAAAGTGAGAATAGCTTTTGGTATGACATGATGCCTGCACCAGGAG						12000	
		ATATTA AATTTATAGAAAGTGAGAATAGCTTTTGGTATGACTGAAGGCCCGGGCAAAAAA						660	
								
AB860415	12001	ATAAAT	12006						
SGP 71	661	AAAAAA	666						

Enterotoxina H (gen *seh*)

			420	430	440	450	460	470	
		
AJ937548	411		CAACTGCTGATTTAGCTCAGAAGTTTAAAAATAAAAAATGTAGATATATATGGGGCATCTT						470
SGP 2	1		CAACTGCTGATTTAGCTCAGAAGTTTAAAAATAAAAAATGTAGATATATATGGGGCATCTT						60
			480	490	500	510	520	530	
		
AJ937548	471		TTTAT-TATAAGTGTGAAAAATAAGTGAAAATATTTCTGAATGTCCTATATGGAGGTACA						529
SGP 2	61		TTTATATATAAGTGTGAAAAATAAGTGAAAATATTTCTGAATGTCCTATATGGAGGTACA						120
			540	550	560	570	580	590	
		
AJ937548	530		ACACTAAATAGTGAAAAATTGGCACAGGAAAGGGTGATGGTGCTAATGTTTGGGTAGAT						589
SGP 2	121		ACACTAAATAGTGAAAAATTGGCACAGGAAAGGGTGATGGTGCTAATGTTTGGGTAGAT						180
			600	610	620	630	640	650	
		
AJ937548	590		GGTATTCAAAAAGAAACAGAATTAATACGAACAAATAAGAAAAATGTGACATTGCAAGAA						649
SGP 2	181		GGTATTCAAAAAGAAACAGAATTAATACGAACAAATAAGAAAAATGTGACATTGCAAGAA						240
			660	670	680	690	700		
		
AJ937548	650		TTAGATATAAAGATCAGAAAAATATTGTCCGATAAATATAAAATTTATTAT						701
SGP 2	241		TTAGATATAAAGATCAGAAAAATATTGTCCGATAAATATAAAATTTATTAT						292

Hemolisina alfa (gen *hla*)

			200	210	220	230	
		
EF543163	194		AGTTCTCTGC-TGCTTTCATAGAACCATCTCTAGTTTTCATGAAA				237
SGP 29	1		AGTTCTCTGCATGCTTTCATAGAACCATTTCTAGTTTTCATGAAA				45

Hemolisina beta (gen *hlb*)

			850	860	870	880	890	
		
JN580071	844		GTTTACAATGATTTTTTCAGATCATTATCCAATCAAAGCCTATAGTAAA					891
SHN 67	1		GTTTACAATGATTTTTTCAGATCATTATCCAATCAAAGCCTATAGTAAA					48

Toxina exfoliativa A (gen *eta*)

```

                42180   42190   42200   42210   42220   42230
                |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
AP008953  42180  GTTTCAGCA--GAAGAAATAAAAAACATGAAGAGAAATGGAATAAGTACTATGGTGTCA 42237
SCM 17    1     GTTTCAGCATGAAAGAAATAAAAAACATGAAGAGAAATGGAATAAGTACTATGGTGTCA 60

                42240
                |...
AP008953  42238  ATGCA 42242
SCM 17    61    ATGCA 65
```

Toxina exfoliativa B (gen *etb*)

```

                54530   54540   54550   54560   54570   54580
                .|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
AP012467  54524  TTATTACCACTAAAAATAGTGAAACTAAAATTAAAATTCGGATTAATAATATTATTAGTG 54583
SCM 50    1     TTATTACCACTAAAAATAGTGAAACTAAAATTAAAATTCGGATTAATAATATTATTAGTG 60

                54590   54600   54610   54620   54630   54640
                .|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
AP012467  54584  TTACTTAATAAATTTATACCACCTAATACCCTAATAATCCAAAAACAGAAAATACTAT-T 54642
SCM 50    61    TTACTTAATAAATTTATACCACCTAATACCCTAATAATCCAAAAACAGAAAATACTATCT 120

                54650   54660
                .|...|...|...|
AP012467  54643  AGGTATATTATCGATGG 54659
SCM 50    121   AGGTATATTATCGATGG 137
```